

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICIA I
GINECOLOGIA

DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DE LA ENDOMETRIOSIS.
PAPEL DE LA INTERLEUQUINA-6 EN SUERO.

VICENTA SUSANA MARTÍNEZ CUENCA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de novembre de 2006 davant un tribunal format per:

- Dr. Alfonso Herruzo Nalda
- Dr. Francisco Jose Quereda Seguí
- Dr. José Remohí Gimenez
- Dr. José Schneider Fontan
- Dr. Carlos Simón Valles

Va ser dirigida per:

Dr. Antonio Pellicer Martínez

©Copyright: Servei de Publicacions
Vicenta Susana Martínez Cuenca

Dipòsit legal: V-4101-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-8085-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y
Ginecología



Diagnóstico no invasivo de la endometriosis.
Papel de la interleuquina-6 en suero.

Tesis doctoral
V. Susana Martínez Cuenca
Valencia, 2006

Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de
Pediatria, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la
Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: *Diagnóstico no invasivo de la endometriosis. Papel de la interleuquina-6 en suero* ha sido realizado íntegramente por Dña. V. Susana Martínez Cuenca bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 1 de Septiembre de 2006.

Fdo. Antonio Pellicer Martínez

A mis padres

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado de alguna forma en la elaboración de esta tesis:

A Antonio Pellicer, porque la idea nació de ti y has dejado que yo la lleve a cabo, contando en todo momento con tu apoyo y consejo. Por haberme acogido tras mi vuelta a Valencia, porque siempre es un placer trabajar a tu lado.

A José Luis Coperias, por tu desinteresada e inestimable ayuda en el desconocido mundo de la estadística, por tu inmediata disponibilidad en solucionar mis dudas, por tu dedicación.

A Alfredo Perales, por estar ahí cuando te necesité.

A Nicolás Garrido, por ser tan cariñoso y dispuesto, por hacerme ver que “la investigación es así”. Un placer trabajar contigo.

A Julia Desco y Paco Pardo, por ser mis ojos cuando yo tenía que estar mirando a otro lado.

A César Lizán, compañero y amigo, por tu ayuda desinteresada, por tu paciencia infinita delante del ordenador.

A Nerea Ruiz y Begoña Pellicer, amigas y compañeras, por levantarme los ánimos cuando estaba tocando fondo, por poder contar con vosotras siempre.

A todos mis compañeros del H. U. Dr. Peset, por ser tan estupendos y hacerme sentir tan a gusto en mi trabajo.

A La Isa, Isa Termia, Mamen, Pilu, Lucia, Javi, Andrés y Michel, por vuestro interés por mi trabajo y por hacer que me olvidase de él a ratos.

A Celia, Dolores, Ajo, Laura, Ruth, Gema, Leo y Sofía, por vuestro ánimo y calor.

A Olga y María, por su interés y consejos, por compartir sus conocimientos informáticos.

A mis hermanos, Silvia y Juanma, y a mis sobrinos, Carlos y Héctor, por ser mi mejor apoyo y mi alegría.

A mis padres, Micaela y Juan, por estar siempre ahí aunque no me lo mereciese, por vuestro amor sin límites, por vuestro sacrificio constante. Sólo espero que algún día pueda estar a la altura del ejemplo que me habéis dado y podáis estar lo orgullosos que yo lo estoy de vosotros.

A todo aquel que ha contribuido a la elaboración de esta tesis y que por olvido, no mal intencionado, no encuentre su nombre entre los anteriores. Gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 CONCEPTO	5
1.2 ETIOPATOGENIA	7
1.3 INMUNOLOGÍA Y ENDOMETRIOSIS	10
1.3.1. INMUNIDAD CELULAR	11
1.3.2. INMUNIDAD HUMORAL	17
1.3.3. LÍQUIDO PERITONEAL	20
— INTERLEUQUINA-6	26
1.4 DIAGNÓSTICO	35
1.4.1. CLÍNICA	35
1.4.2. EXPLORACIÓN GINECOLÓGICA	41
1.4.3. TÉCNICAS DE IMAGEN	42
1.4.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS	45
1.4.5. LAPAROSCOPIA	57
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	63
3. OBJETIVOS	67
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	69
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	69

4. MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	73
4.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS	78
4.2.1. DETERMINACIÓN DE INTERLEUQUINA-6	80
4.2.2. DETERMINACIÓN DE CA-125	80
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
5. RESULTADOS	83
5.1 COMPARACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LOS GRUPOS	85
5.2 RESULTADOS DE IL-6 EN SUERO	86
5.3 RESULTADOS DE CA-125 EN SUERO	89
5.4 VALOR DIAGNÓSTICO	92
5.4.1. ENDOMETRIOSIS VS. NO ENDOMETRIOSIS	93
5.4.2. ENDOMETRIOSIS III-IV VS. NO ENDOEMTRIOSIS III-IV	96
5.4.3. ENDOMETRIOSIS I-II VS NO ENDOMETRIOSIS I-II	98
6. DISCUSIÓN	101
7. CONCLUSIONES	117
8. BIBLIOGRAFÍA	121

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una entidad patológica todavía llena de controversias, desde el desconocimiento de su verdadera incidencia así como el de su etiopatogenia, a sus distintas formas anatomopatológicas que han hecho sugerir entidades diferentes por algunos autores, hasta la clasificación más utilizada es para algunos insuficiente, junto con la búsqueda incesante del elemento diagnóstico no invasivo y el eterno debate entre tratamiento médico vs. quirúrgico.

1.1. CONCEPTO

La endometriosis se define como la presencia de glándulas y estroma endometrial funcionantes fuera de la cavidad uterina. Se trata de un proceso invasivo, no neoplásico, caracterizado por la existencia de endometrio ectópico.

La incidencia de la endometriosis se desconoce, ya que la enfermedad se presenta en muchas mujeres de forma asintomática. El único estudio de incidencia (número de nuevos casos diagnosticados por unidad de tiempo) en la población general fue realizado en Rochester, Minnesota, entre los años 1970-1979. Se estudiaron 157.135 mujeres-año y el resultado fue que el 0.3% de las mujeres blancas en edades entre quince y cuarenta y nueve años eran diagnosticadas como nuevos casos cada año (Houston y cols., 1987). Si bien, se ha encontrado que la frecuencia de endometriosis ha aumentado espectacularmente en los últimos años, lo que quizás refleje el uso más habitual de métodos diagnósticos como la laparoscopia, o quizás pueda reflejar un incremento real (Houston, 1994).

Clásicamente se calcula que la prevalencia de esta enfermedad en la población general es del 3-10% de las mujeres en edad reproductiva, pero si consideramos el grupo de pacientes estériles aumenta al 25-40% (Cramer, 1987; Olive y cols., 1993). Un reciente trabajo ha puesto de manifiesto que se encuentra en el 32% de pacientes supuestamente sanas (Matorras y cols., 2001).

1.2. ETIOPATOGENIA

Las teorías que tratan de explicar el origen de la endometriosis se pueden agrupar en dos categorías:

- Por trasplante o diseminación de células endometriales que englobaría a la **teoría de implantación por menstruación retrógrada** a través de las trompas de Falopio (Sampson, 1927); la **teoría de trasplante mecánico**, iatrogénica tras la práctica de cesárea, episiotomías e histerectomías; la **teoría de metástasis linfáticas y vasculares** que explicarían localizaciones extraperitoneales y la **teoría uterotubárica** por extensión a través de la musculatura uterina o tubárica lo que explicaría la endometriosis postsalpinguectomía.
- Por metaplasia que englobaría la **teoría de la metaplasia celómica** basándose en el mismo origen embriológico del conducto de Müller, epitelio germinal ovárico y peritoneo pélvico que explicaría casos de

endometriosis en mujeres que nunca han menstruado como en la endometriosis presentada por una paciente con síndrome de Rokitansky-Kuster-Hauser (Rosenfel y Lecher, 1981) y la **teoría de la inducción o integradora** en la que sustancias liberadas por endometrio necrótico serían las que inducirían a la metaplasia de las células peritoneales.

Desafortunadamente, ninguna de estas teorías es capaz de explicar todos los casos de endometriosis. Un reciente estudio propone que los tres tipos de lesiones endometriósicas – peritoneal, ovárica y rectovaginal – deberían ser consideradas como entidades separadas, cada una con diferente patogenia. La teoría de la implantación podría explicar la endometriosis peritoneal. Estos autores postulan que la metaplasia celómica del epitelio invaginado causaría la endometriosis ovárica. La endometriosis rectovaginal la explicarían como nódulos de adenomiosis por la metaplasia de remanentes mullerianos localizados en el tabique rectovaginal (Nisolle y Donnez, 1997).

Actualmente, la teoría con mayor aceptación es la de la menstruación retrograda, que fue la primera en ser descrita (Sampson, 1927). Está apoyada por la distribución de las lesiones en la cavidad abdominal: ovarios, fondo de saco de Douglas y uterosacros (Jenkins y cols., 1986); por la alta prevalencia de endometriosis en niñas con obstrucción congénita del tracto de salida al flujo menstrual (Sanfilippo y cols., 1986); por la comprobación de la viabilidad de endometrio del flujo menstrual en cultivos celulares (Keetel y Stein, 1951; Koks y cols., 1997) y por la inducción de endometriosis en experimentos animales mediante fístulas uteropélvicas artificiales (Te Linde y Scott, 1950) o forzando un flujo menstrual retrógrado al crear una obstrucción anterógrada (D'Hooghe y cols., 1994). Además, un estudio reciente demuestra la capacidad del endometrio de adherirse a la superficie mesotelial del peritoneo (Witz y cols., 1999).

El paso de fragmentos endometriales a cavidad abdominal de forma cíclica parece ser fisiológica en la mayoría de las mujeres en edad reproductiva con trompas permeables, sin embargo sólo un 10% de ellas desarrollarán una endometriosis clínica. Por ello, se ha sugerido que estás

mujeres puedan tener un fallo en el sistema inmunitario que permita que las células endometriales sobrevivan, se adhieran y proliferen en la superficie peritoneal u otro lugar ectópico.

1.3. INMUNOLOGÍA Y ENDOMETRIOSIS

La teoría de la implantación es la dominante en la actualidad, la menstruación retrograda se ha objetivado en el 76-90% de las mujeres a las que se practica diálisis peritoneal o laparoscopia pero sólo un 6-10% sufren endometriosis, esto sugiere que otros factores deben estar implicados en su desarrollo.

La habilidad del tejido endometrial en sobrevivir en localizaciones ectópicas puede ser debida a una respuesta inmune inapropiada. El papel de la inmunidad en la endometriosis ha sido ampliamente estudiado y se han identificado numerosas anomalías, pero si éstas son causa o consecuencia de la endometriosis todavía no está resuelto.

1.3.1. INMUNIDAD CELULAR

1.3.1.1. INMUNOVIGILANCIA

Las células endometriales presentan una resistencia a la apoptosis y fagocitosis en las pacientes con endometriosis (Braun y cols., 1998; Dmowski y cols., 1998).

Los mecanismos por los cuales las células endometriales son limpiadas de la cavidad peritoneal en la mayoría de las mujeres son poco conocidos, pero se ha sugerido que las **células natural killer** (NK) tienen un papel importante en esta acción.

Las células NK son células efectoras que habitualmente reconocen y destruyen células tumorales, células infectadas por virus y células extrañas transplantadas.

Se ha demostrado un descenso en la citotoxicidad de las células NK tanto periféricas como en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis tanto para endometrio autólogo como para heterólogo, el cual es más pronunciado en los estadios moderado y severo de la enfermedad (Oosterlynck y cols., 1991). Estos hallazgos han sido confirmados por otros autores tanto en suero (Kanzaki y cols., 1992) como líquido peritoneal (Ho y cols., 1997).

Los mecanismos que suprimen la actividad de las NK todavía no están claros. Wu y cols. han postulado un aumento en la expresión del receptor inhibitorio (KIR) de las células NK del líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (2000).

Otro mecanismo por el cual la inmunovigilancia no puede ser llevada a cabo podría ser por la secreción de proteínas que interfieren con el reconocimiento de la célula endometrial por el inmunocito. Este factor es la forma soluble de la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1. El ICAM-1 es una molécula de superficie que actúa como ligando para el antígeno de

función leucocitaria (LFA)-1 que se expresa en la superficie de varias células inmunitarias, y el complejo ICAM-1/LFA-1 es mediador en varias interacciones involucradas en la respuesta inmune. La liberación de la forma soluble sICAM-1 genera, pues, un receptor soluble que se une con LFA-1 de los leucocitos impidiendo su unión con la ICAM-1 de la superficie celular de las células diana, bloqueando de esta forma la activación de los leucocitos. Viganò y cols. demostraron que células del estromales endometriósicas expresaban más sICAM-1 mRNA y secretaban más sICAM-1 que conjuntos de células estromales de endometrio eutópico (1998).

Otra hipótesis está relacionada con el complejo Fas - Fas ligando (FasL). Cuando el FasL expresado por células diana se une al Fas de las células inmunes desencadena la muerte celular por apoptosis de éstas últimas. García-Velasco y cols. demostraron que en un medio de macrófagos condicionados se inducía la expresión de FasL en las células estromales endometriales, lo que sugiere que los macrófagos peritoneales en

la endometriosis pueden estimular la apoptosis de células inmunes por el complejo Fas-FasL (1999a).

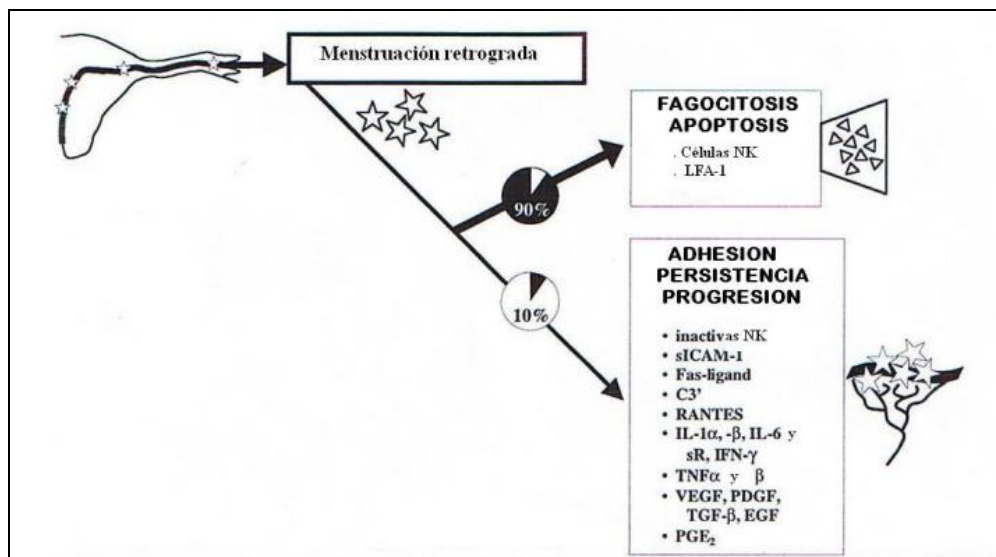


Figura 1. En la mayoría de las mujeres (90%) se produce la fagocitosis o apoptosis de las células endometriales regurgitadas. En el 10% restante se produce la adhesión, persistencia y progresión de los fragmentos intraperitoneales que se definen como lesiones endometrióticas. Varias proteínas inflamatorias son responsables de este hecho. (Tomado de Lebovic, 2001).

1.3.1.2. MACRÓFAGOS

Las pacientes con endometriosis presentan un aumento en el número de macrófagos peritoneales, así como una activación funcional de estos en comparación con pacientes normales (Haney, 1981; Halme, 1987; Dunselman y cols., 1988a). En asociación con el estado activado de los macrófagos, hay un aumento en la liberación de sus productos, como factores de crecimiento y citoquinas, que puede afectar a la supervivencia y crecimiento ectópico de las células endometriales (Lebovic y cols., 2001).

Por otro lado, se ha descrito una deficiente función en la actividad fagocitaria de los macrófagos. Una hipótesis apunta a alteraciones a nivel de funcionamiento de receptores por la influencia de niveles alterados de citoquinas y hormonas en el líquido peritoneal (Sidell y cols., 2002). También se ha demostrado que cuando los macrófagos peritoneales no están adheridos a componentes de la matriz extracelular pueden no ser competentes en la fagocitosis, a pesar de su estado de diferenciación.

Además, el número de macrófagos no adherentes está aumentado en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (Olive y cols., 1995).

Haney y cols. han demostrado una relación inversa entre el número total de macrófagos peritoneales y la extensión de la endometriosis pélvica (1991). Asimismo la citotoxicidad de estos macrófagos está disminuida en pacientes con endometriosis severa en comparación con endometriosis leve y/o controles fértiles (Braun y cols., 1992).

Estos hechos apoyan el concepto de que a mayor extensión de la enfermedad el grado de actividad inflamatoria peritoneal disminuye. Dicho de otra forma, en los estadios I y II de la enfermedad las lesiones son bioquímica e inmunológicamente activas, mientras que en los estadios III y IV las lesiones son crónicas o residuales (Rock y cols., 1990).

1.3.1.3. LINFOCITOS T

Se ha descrito un aumento en la proporción de linfocitos T colaboradores frente a los T supresores y en la concentración de ambas poblaciones en el líquido peritoneal (Dmowski y cols., 1994) y en tejido endometrioso ectópico (Witz y cols., 1994) comparado con endometrio eutópico de mujeres con endometriosis. Por inmunohistoquímica, no se han encontrado diferencias significativas en la proporción de linfocitos T colaboradores con los T supresores entre el endometrio eutópico de pacientes con y sin endometriosis (Mettler y cols., 1996). Con todo, las alteraciones en los linfocitos T y su papel en la endometriosis parecen ser inconsistentes hasta el momento (Berkkanoglu y Arici, 2003)

1.3.2. INMUNIDAD HUMORAL

Desde que en 1980 se describiesen alteraciones en la actividad de los linfocitos B y la existencia de autoanticuerpos tanto organoespecíficos como

inespecíficos en mujeres con endometriosis se han encontrado numerosas alteraciones en la inmunidad humoral (Tabla 1).

Tabla 1. *Resumen de las alteraciones en la inmunidad humoral en la endometriosis.*

Aumento en la función de los linfocitos B.	Startseva 1980
Activación policlonal de los linfocitos B.	Hang y cols. 1983
Depósitos de IgG y complemento en endometrio eutópico.	Weed y cols. 1980
Autoanticuerpos IgG e IgA contra antígenos endometriales.	Mathur y cols. 1982, 1990
Aumento de niveles C3 y C4 en suero y líquido peritoneal.	Badawy y cols. 1984
Aumento de autoanticuerpos IgG, IgM y IgA contra fosfolípidos, histonas y polinucleótidos.	Gleicher y cols. 1990

Tomada de Berkkanoglu y Arici, 2003.

La endometriosis cumple la mayoría de las características clásicas de enfermedad autoinmune: activación policlonal de los linfocitos B, daño tisular, afectación multiorgánica, predominancia en sexo femenino,

predisposición familiar y coincidencia aumentada con otras enfermedades autoinmunes (Hang y cols., 1983; Prud'homme y cols., 1983). Sin embargo, todavía existen problemas para postular y aceptar la endometriosis como una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes están asociadas a un alelo de HLA. Aunque existe una fuerte asociación genética en la endometriosis (Malinak y cols., 1980), no se ha demostrado todavía ninguna asociación con un haplotipo específico de HLA (Maxwell y cols., 1989). Además, para definir una enfermedad como autoinmune, es necesario que se manifieste en un animal sano tras transferirle inmunoglobulinas de la sangre o tejidos afectados de sujetos con la enfermedad autoinmune, pero todavía no hay ningún estudio realizado al respecto (Nothnick, 2001).

El aumento de autoinmunidad endometrial en las pacientes con endometriosis puede ser debido a una predisposición genética a la autoinmunidad o a un exceso de autoantígenos endometriales en la cavidad peritoneal por la menstruación retrograda repetitiva. Sin embargo, no todos los investigadores han sido capaces de documentar estos autoanticuerpos

(Meek y cols., 1988; Switchenko y cols., 1991) y este tema permanece controvertido (Mathur y Chihal, 1992).

1.3.3. LÍQUIDO PERITONEAL

El líquido peritoneal y sus componentes dependen de la actividad folicular, de la vascularización del cuerpo lúteo y de la producción hormonal.

El volumen del líquido peritoneal varía durante el ciclo menstrual, alcanzando el pico máximo de 20 ml en la ovulación. Al analizar el volumen de líquido peritoneal, Syrop y Halme encontraron que las mujeres con endometriosis tenían mayor volumen que las controles, mujeres fértiles, que las pacientes con síndrome adherencial y que las que presentaban esterilidad de origen desconocido (1987a).

En cuanto al contenido, encontramos distintas células libres, incluidos macrófagos, células mesoteliales, linfocitos y eosinófilos entre

otras. Normalmente, el líquido peritoneal contiene leucocitos en una concentración de $0,5$ a 2×10^6 / ml de los cuales aproximadamente el 85% son macrófagos (Syrop y Halme, 1987b). Es por esto que la activación de los macrófagos, que se ha demostrado aumentada en las pacientes con endometriosis, puede ser un importante contribuidor a la patogénesis de la misma, al ser la principal fuente de citoquinas y factores de crecimiento, aunque no la única como ahora veremos. Así pues, el líquido peritoneal contiene un *cocktail* rico en citoquinas que vamos a intentar desenmarañar.

1.3.3.1. CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Las citoquinas y los factores de crecimiento son proteínas o glicoproteínas producidas por leucocitos y otras células. Estas moléculas son pleiotrópicas, es decir, ejercen múltiples efectos al actuar sobre diversos tipos celulares en los que inducen distintos efectos, así como redundantes, esto es, comparten muchos de los efectos. Las citoquinas deben considerarse como miembros de una red funcional con retroregulaciones positivas y negativas entre sí, dado que una citoquina no actúa sola sino con otras

producidas concomitantemente por la misma u otras células y, además, puede inducir, potenciar o inhibir la producción de otras citoquinas y/o modular negativa o positivamente los efectos de dichas citoquinas.

Las citoquinas actúan de forma autocrina, sobre ellas mismas y las células que las producen, y de forma paracrina, sobre otras células vecinas, aunque a veces pueden circular por sangre y actuar de forma endocrina como la interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral α . Pueden tener efectos proliferativos, citostáticos, quimiotácticos o de diferenciación celular.

La principal fuente de citoquinas son los macrófagos. Citoquinas quimiotácticas como RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted*) y la IL-8 facilitan el reclutamiento de macrófagos en la cavidad peritoneal. La segunda fuente de citoquinas son los linfocitos T. Los linfocitos T colaboradores o *helper* se clasifican a su vez en dos subtipos, los Th1 y Th2. Los linfocitos Th1 son productores de IL-2, IL-12 e interferón- γ , los cuales son potentes inductores de la inmunidad celular. Los

linfocitos Th2 producen sobretodo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13, que suprimen la inmunidad celular. En pacientes con endometriosis, las citoquinas secretadas por los Th2 están más elevadas. Esta alteración puede ser parcialmente responsable del empeoramiento de la defensa inmunitaria en estas pacientes (Hsu y cols., 1997).

Se han hallado niveles aumentados de citoquinas en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis lo que refleja una síntesis aumentada de éstas por los macrófagos, linfocitos, células mesoteliales e implantes endometriósicos del peritoneo (Wu y Ho, 2003).

En la tabla 2 se muestran las alteraciones encontradas a lo largo de los estudios publicados.

Tabla 2: Alteraciones de los niveles de citoquinas peritoneales en la endometriosis.

Aumentado	Sin cambios	Disminuido
IL-1 α , IL-1 β	IL-8	IL-2
IL-4	IL-13	IL-5
IL-5	IFN- γ	IL-13
IL-6	ROS	IFN- γ
IL-8	TNF- α	
IL-10	Antioxidantes	
Antioxidantes		
Bcl-2		
ROS		
sICAM-1		
TGF- β		
TNF- α		
VEGF		

IL, interleuquina; IFN, interferón; ROS, especies oxígeno reactivas; sICAM, molécula de adhesión intercelular soluble; TGF, factor de crecimiento transformador ; TNF, factor de necrosis tumoral; VEGF, factor de crecimiento de endotelio vascular.

Tomada de Wu y Ho, 2003.

Estas alteraciones hacen pensar en un posible papel de las citoquinas y factores de crecimiento en la patogénesis de la endometriosis. Otra prueba indirecta de esta relación nos viene dada por el efecto beneficioso del tratamiento con inmunomoduladores tanto en modelos animales experimentales, como el interferón- α -2b (Ingelmo y cols., 1999), como en

pacientes con endometriosis, tales como IL-2 recombinante (Acién y cols., 2005, 2003; Velasco y cols., 2005) o terapias anti-TNF- α (Nothnick, 2001). Así, citoquinas y factores de crecimiento probablemente sean responsables de la proliferación de células endometriales (Hammond y cols., 1993; Iwabe y cols., 2000) y su implantación (Zhang y cols., 1993). Además, las citoquinas aumentan la remodelación tisular a través de su influencia sobre la metaloproteasas de la matriz extracelular (Osteen y cols., 1999) y la angiogénesis del tejido endometrial ectópico (Taylor y cols., 1997).

Interleuquina-1

La interleuquina (IL)-1 está secretada principalmente por los macrófagos pero también por linfocitos T y B y por células NK. Dentro de sus efectos encontramos la activación de los linfocitos T y la diferenciación de los B. Se distinguen dos formas moleculares de IL-1 (IL-1 α y IL-1 β) derivadas de dos genes diferentes.

Se ha sugerido que la IL-1 β tiene un papel promoviendo la angiogénesis en las lesiones endometriósicas al inducir factores

angiogénicos (factor de crecimiento del endotelio vascular y IL-6) en células estromales endometriósicas pero no en las del endometrio normal (Lebovic y cols., 2000). También se ha encontrado que la IL-1 β aumenta el sICAM-1 liberado por las células endometriales, lo cual interfiere en la inmunovigilancia (Viganò y cols., 1998).

Interleuquina-6 (IL-6)

La IL-6, citoquina proinflamatoria junto con IL-1 y TNF- α , es una 23-26 KDa fosfoglicoproteína producida por macrófagos, linfocitos Th2, fibroblastos, células endometriales, queratinocitos y células de músculo liso vascular.

Células endometriales como fuente de IL-6

Las células endometriales, epiteliales y estromales, producen IL-6 en respuesta a hormonas y otros activadores inmunológicos. Su producción es

inducida por IL-1 β , TNF- α , factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) e interferón γ (Laird y cols., 1993).

Tseng y cols. estudiaron la producción de IL-6, basal y estimuladas por IL-1 β , de células estromales endometriósicas, células estromales de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y de pacientes sin la enfermedad, encontrando que la secreción de IL-6 por las lesiones ectópicas era significativamente mayor. La secreción de IL-6 por el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis alcanzó niveles intermedios, mientras que la IL-6 producida por el endometrio eutópico de mujeres sanas tuvo los niveles más bajos, resultados similares se obtuvieron cuando las células fueron estimuladas con IL-1 β . (1996). Tsudo y cols. demostraron que las células endometriósicas constitutivamente expresan RNA mensajero de IL-6 y producen la correspondiente proteína y que añadiendo TNF- α estimula al gen IL-6 y su producción de una forma dosis dependiente (2000). Esto sugiere que las células endometriales de las mujeres que desarrollan endometriosis pueden ser funcionalmente diferentes de las de las mujeres que no la padecerán (Harada y cols., 2001).

Mecanismo de acción

Entre sus diversas acciones se encuentran intensificar la diferenciación de los linfocitos B, estimular la activación de los linfocitos T, inducir la síntesis de proteínas de fase aguda, modular la secreción de otras citoquinas y factores de crecimiento, desempeñar un papel en la osteoclastogenesis y en la hematopoyesis (Gorospe y cols., 1992), tener un efecto angiogénico (Taylor y cols., 2002a) y puede inhibir la proliferación de células estromales del endometrio humano (Zarmakoupis y cols., 1995) en la fase secretora del ciclo (Yoshioka y cols., 1999).

Las células estromales de los implantes endometriósicos pueden comportarse de forma distinta o tener características biológicas diferentes a las del endometrio eutópico ya que estos mismos autores han encontrado que son resistentes al efecto inhibitorio de la IL-6. Rier y cols. proponen que se debe a que la expresión de IL-6R en la superficie celular está disminuida (1995).

Niveles de IL-6 en líquido peritoneal y en sangre

En el líquido peritoneal han sido encontrados niveles de IL-6 aumentados en pacientes con endometriosis comparadas con mujeres sanas (Punnonen y cols., 1996; Harada y cols., 1997; Mahnek y cols., 2000) y los niveles de IL-6 en líquido peritoneal se correlacionan bien con la severidad de la enfermedad (Rier y cols., 1995; Cheong y cols., 2002). Aunque otros autores han encontrado una elevación significativamente mayor en pacientes con estadios I-II que en mujeres con estadios III-IV (Khan y cols., 2002).

Los niveles de IL-6 en sangre los encontraron elevados en mujeres con endometriosis al compararlas con mujeres libres de enfermedad (Bedaiwy y cols., 2002) y con pacientes infértiles (Pellicer y cols., 1998). También Iwabe y cols. encontraron que las concentraciones de IL-6 en sangre eran significativamente mayores en las pacientes con endometriomas ováricos que en aquellas sin endometriomas (2003) y Daraï y cols. (2003) al comparar las pacientes con endometriomas con las que presentaban quistes ováricos benignos.

Sin embargo, otros autores no encuentran diferencias entre los niveles en sangre de IL-6 de mujeres con endometriosis frente a sanas. (Somigliana y cols., 2004).

Influencia del ciclo menstrual en los niveles de IL-6

Se ha sugerido que la producción de IL-6 fluctúa durante el ciclo menstrual. Tabibzadeh en 1989 publicó que los niveles de IL-6 son menores en fase proliferativa del ciclo mientras las concentraciones de estrógenos son altas, y son mayores durante la fase secretora cuando la actividad de los estrógenos es menor; sugiriendo, de esta forma, que las fluctuaciones durante el ciclo menstrual reflejan una relación inversa con la acción de los estrógenos. En este sentido se ve apoyado por otros autores que detectan una disminución de los niveles de IL-6 en suero en ciclos estimulados probablemente como consecuencia de concentraciones mayores de E₂ durante la estimulación ovárica con gonadotropinas (Pellicer y cols., 1998). Sin embargo, Akoum y cols. encuentran que la producción de IL-6 por

células endometriósicas está inhibida por progesterona mientras que el estradiol tiene un efecto inhibitorio limitado (1993).

Por otro lado, se ha descrito que los niveles de IL-6 en sangre no presenten cambios en las distintas fases del ciclo en los estudios diseñados para valorar el papel de la IL-6 en la endometriosis (Bedaiwy y cols., 2002, Iwabe y cols., 2003, Somigliana y cols., 2004; Daraï y cols., 2003).

En los estudios longitudinales, diseñados para evaluar propiamente la IL-6 en relación con el ciclo, o bien no se han encontrado diferencias en los niveles de IL-6 en suero a lo largo del ciclo menstrual (Makinoda y cols., 1996; Chiu y cols., 2000) o bien los niveles de IL-6 en sangre han sido menores en la fase lútea (Angstwurm y cols., 1997; Schwarz y cols., 2000).

Interleuquina-8

La IL-8 induce la quimiotaxis de neutrófilos y es un potente factor angiogénico. Está producida por células mesoteliales, macrófagos y células

endometriales (Arici y cols., 1993). Se ha demostrado que estimula la proliferación en células estromales endometriales y endometriósicas (Iwabe y cols., 1998; Arici y cols., 1998). También se ha encontrado que la IL-8 estimula la adhesión de las células endometriales a la fibronectina (García-Velasco y Arici, 1999b,c) pudiendo, así, ser relevante en la patogénesis de la endometriosis.

Interleuquina-12

La IL-12 está secretada por macrófagos y juega un papel importante en la regulación de la actividad de las células NK. Estimula la secreción de otras citoquinas, la citotoxicidad de las células NK y la proliferación de dichas células y de los linfocitos T.

Se han encontrado niveles más altos de la subunidad libre p40 de la IL-12 en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis comparado con el encontrado en mujeres libres de enfermedad, siendo la subunidad libre p40 un potente inhibidor de la actividad de las células NK inducida por la

IL-12 al disminuir los receptores de IL-12 en dichas células (Mazzeo y cols., 1998).

Factor de crecimiento transformador- β (TGF- β)

El TGF- β está producido por plaquetas, linfocitos activados y macrófagos. Induce quimiotaxis de monocitos, angiogénesis e inhibe la actividad de las células NK. Se han encontrado concentraciones elevadas en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis.

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

Está producido por neutrófilos, linfocitos activados, macrófagos, células NK y varias células no hematopoyéticas.

Su principal función es iniciar la cascada de citoquinas y otros factores asociados con la respuesta inflamatoria. TNF- α ayuda en la activación de los linfocitos T colaboradores.

El TNF- α aumenta la adherencia de las células estromales endometriales a las mesoteliales en cultivo (Zhang y cols., 1993), de ahí que pueda tener un papel facilitador en la adherencia del endometrio ectópico al peritoneo, permitiendo el desarrollo de los implantes. Varios autores han encontrado niveles aumentados de TNF- α en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis y éstos se correlacionan con el estadio de la enfermedad (Eisermann y cols., 1988).

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Es un potente mitógeno para las células endoteliales e induce la permeabilidad vascular, además de actuar como quimiotáctico para monocitos y ser el factor con mayor potencia angiogénica. Está producido por monocitos, macrófagos y fibras musculares lisas.

Se ha demostrado que el VEGF puede estar localizado en las glándulas endometriales y que el estradiol aumenta la expresión de su gen en el endometrio humano normal (Shifren y cols., 1996). La expresión del

VEGF por los implantes endometriales proporciona un mecanismo que puede explicar la neovascularización que se observa comúnmente alrededor de estas lesiones (Nisolle y cols., 1993).

Los niveles de VEGF en líquido peritoneal son significativamente mayores en mujeres con endometriosis moderada y grave que en aquellas que presentan una endometriosis mínima o leve (McLaren y cols., 1996).

1.4. DIAGNÓSTICO

1.4.1. CLÍNICA

La sospecha diagnóstica nos llega de la clínica de la paciente, aunque la endometriosis es a menudo un hallazgo en mujeres asintomáticas que se someten a cirugía por otros motivos, del 7 al 15% en mujeres que se realizan ligadura tubárica vía laparoscópica (Barbieri, 1990).

La sintomatología se presenta como:

Dolor Pélvico

Cursa como dismenorrea (lo presentan 50-90% de las pacientes con endometriosis), dispareunia (25-40%) y/o dolor crónico acíclico. Será más sugestivo de endometriosis si aparece tras años de menstruaciones y relaciones sexuales libres de dolor. Se describe como un dolor profundo en la pelvis, central aunque puede ser unilateral, referido a menudo en el área rectal.

No se ha observado una relación constante entre la intensidad del dolor y el grado de severidad de la endometriosis, es común la observación de pacientes con endometriosis avanzada con poco o sin dolor, mientras que otras con endometriosis mínima refieren dolor intenso, en parte se debe a que la clasificación relaciona la severidad de la enfermedad con la infertilidad y no con el dolor. Además, el dolor severo sí se asocia con

endometriosis de infiltración profunda (Cornillie y cols., 1990; Vercellini y cols., 1996), aspecto no contemplado en la clasificación de la ASRM.

Hemorragia Uterina Disfuncional

Se puede presentar como *spotting* premenstrual, aunque se han descrito todos los tipos de patrones menstruales. Su origen parece residir en la disfunción ovulatoria que se asocia a la endometriosis.

Esterilidad

La asociación entre endometriosis y esterilidad viene avalada por la prevalencia de esta patología en pacientes con esterilidad primaria, entre un 26-45% y esterilidad secundaria entre un 12-25% frente al 3-10% de la población general. Estudios prospectivos de prevalencia de endometriosis en mujeres que sufrieron laparoscopia demostraron que las lesiones endometriósicas eran más frecuentes en mujeres estériles que en mujeres

con dolor pélvico o que se realizaron ligadura tubárica (Mahmood y Templeton, 1991).

No cabe duda sobre el efecto negativo, de índole mecánico, de la endometriosis severa cuando compromete a ovarios y produce adherencias que bloquean la movilidad tubárica o provocan su oclusión. Aparte de que puedan tener una reserva ovárica disminuida independientemente de la edad, como han demostrado algunos estudios (Hock y cols., 2001; Azem y cols., 1999).

La relación entre endometriosis mínima y leve y esterilidad es todavía incierta. Se han publicado estudios apoyando esta relación como el de Marcoux y cols., 1997, de 341 pacientes, randomizado, en él las pacientes con endometriosis I-II tratadas con ablación o resección de las lesiones tuvieron una tasa de gestación espontánea del 30,7% en los siguientes 6 meses frente al 17,7% de las que se sometieron únicamente a laparoscopia diagnóstica. Sin embargo, un trabajo muy similar del Grupo Italiano (Parazzini, 1999) no encontró ninguna mejoría en la tasa de

embarazo al tratar laparoscópicamente las endometriosis I y II (24% en las tratadas frente a 29% en las no tratadas), pero el tamaño de la muestra era menor.

La fecundación *in vitro* nos ha permitido observar una calidad disminuida en los embriones obtenidos de las pacientes con endometriosis (Pellicer y cols., 1995; Brizek y cols., 1995) y esto sería responsable de la baja tasa de implantación en estas pacientes, según se demuestra en estudios realizados con donación de óvulos (Simón y cols., 1994; Pellicer y cols., 1994; Sung y cols., 1997). La calidad embrionaria viene determinada por alteraciones en el ovocito secundarias a alteraciones en la foliculogenesis y del medio ambiente paracrino y autocrino intrafolicular que sufren las pacientes con endometriosis (Pellicer y cols., 1998; Garrido y cols., 2000).

Otros síntomas dependientes de la localización de implantes.

- La infiltración del fondo de saco de Douglas y de las paredes laterales de la pelvis puede ser causa de dispareunia profunda, dolor lumbar, disquecia e incluso dolor irradiado a las extremidades inferiores.

- La endometriosis en la vejiga o del uréter puede ser causa de disuria, hematuria y obstrucción ureteral.
- La afectación del colon, del intestino delgado o del apéndice puede explicar la existencia de síntomas semejantes a los del colon irritable, tenesmo perimenstrual, disquecia, hematoquecia, síntomas obstructivos o incluso apendicitis.
- La endometriosis pleural y pulmonar es rara y puede manifestarse en forma de dolor torácico pleural o hemoptisis durante la menstruación y menos frecuentemente como derrame pleural o neumotórax postmenstruales.
- El canal inguinal y el tejido subumbilical pueden ser dolorosos y presentar tumefacción e incluso sangrado como consecuencia de endometriosis.
- Las incisiones quirúrgicas de la pared abdominal en casos de cesárea y las episiotomías son ubicaciones posibles de endometriosis.

1.4.2. EXPLORACIÓN GINECOLÓGICA

Se recomienda realizar el examen durante la menstruación, cuando es más fácil detectar dolor a la palpación.

Dentro de los hallazgos exploratorios que nos van a sugerir la presencia de endometriosis destacamos:

- Dolor a la movilización uterina y ovárica
- Sensibilidad aumentada en los ligamentos uterosacros
- Nódulos palpables uterosacros y/o masas anexiales
- Movilidad disminuida de útero y/o anejos.

Existen pocos trabajos que evalúen la capacidad predictiva de la exploración pélvica, en ellos se recoge una sensibilidad del 76% y especificidad del 73% para una exploración positiva considerada como dolor o nodularidad en ligamento uterosacro y/o fondo de saco de Douglas, lesiones vaginales endometriósicas, masas ováricas fijas o dolorosas, útero fijo o dolor a la

movilización uterina (Eskenazi y cols., 2001), aunque es muy superior al 60% de precisión diagnóstica publicada por Chapron y cols. (2002).

1.4.3. TÉCNICAS DE IMAGEN

1.4.3.1. ECOGRAFÍA TRANSVAGINAL

La ecografía transvaginal posee un alto grado de exactitud en el diagnóstico de los endometriomas, como demuestran los datos del estudio clásico de Mais y cols. (1993) con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 99% que son corroborados por otros autores (Guerreiro y cols., 1995; Bazot y cols., 2003), en cambio es insuficiente para el diagnóstico de los implantes peritoneales y endometriosis profunda, aunque este último (Bazot y cols., 2003) publicaron que en manos de ecografistas bien entrenados la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para el diagnóstico de endometriosis en uterosacros es de 75%, 83% 95% y 45% respectivamente y para la endometriosis rectosigmoidal

del 95%, 100%, 100% y 89% respectivamente, mejorando los resultados aportados por la ultrasonografía endoscópica rectal.

El uso del Doppler pulsado no mejora los resultados de la ecografía transvaginal (Alcázar y cols., 1997).

La ecografía transvaginal también se demuestra útil en el diagnóstico de la endometriosis vesical si el tamaño de las lesiones es suficiente (Fedele y cols., 1997), ya que con un tamaño menor de 5-10 mm resulta ineficaz (Bazot y cols., 2003)

1.4.3.2. ECOGRAFÍA TRANSRECTAL

Ohba y cols. en 1996 identificaron lesiones endometriósicas en ligamentos uterosacros cuando presentan irregularidades y engrosamiento en las imágenes hipoeoicas y homogéneas con forma de arco que se observan a cada lado del cérvix uterino.

1.4.3.3. ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA RECTAL

Recomendada por algunos autores (Chapron y Dubuisson, 2001) para identificar lesiones en tabique rectovaginal y ligamento uterosacro. La ventaja que presenta sobre la ecografía transvaginal es que nos permite determinar con exactitud la distancia entre la lesión y el margen anal, así como su profundidad en la pared rectal. Pero la alta frecuencia que se usa en la técnica, que nos permite una mejor definición de las lesiones, hace que pierda profundidad por lo que no es válida para el diagnóstico de endometriomas ni lesiones en la pelvis anterior (Bazot y cols., 2003).

1.4.3.4. RESONANCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

La RNM tiene una sensibilidad y especificidad comparable a la ecografía transvaginal para el diagnóstico de los endometriomas (Guerreiro y cols., 1995). Estudios más recientes sugieren que puede diagnosticar endometriosis profunda que afecte a los ligamentos uterosacros, la vejiga, y

el saco de Douglas pero carece de sensibilidad para detectar endometriosis rectal sin distensión del recto (Kinkel y cols., 1999).

La modalidad de supresión grasa de la RNM parece ser una promesa para el diagnóstico de la endometriosis superficial en casos seleccionados, siendo útil para el diagnóstico de defectos peritoneales pero no tiene sensibilidad para identificar lesiones peritoneales ni definir la extensión de la enfermedad (Stratton y cols., 2003; Takahashi y cols., 1996).

1.4.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS

Numerosos marcadores están siendo estudiados como herramienta diagnóstica en la endometriosis pero hasta el momento sólo el CA-125 está establecido en la clínica diaria. En la tabla 3 se presentan algunos marcadores sugeridos por diversos autores.

Tabla 3: Marcadores de endometriosis

Marcadores tumorales y polipéptidos

1. CA-125, CA-19.9
2. sICAM-1
3. PP-14

Marcadores genéticos

1. EGR-1 gen
2. P 450 aromatasa
3. PP-14

Marcadores inmunológicos

1. Citoquinas: IL-6
2. Autoanticuerpos:
 - Antiendometriales
 - Autoanticuerpos para marcadores de estrés oxidativo

Marcadores tisulares

1. Aromatasa P 450
2. Receptores hormonales

Tomada de Bedaiwy y Falcone, 2004.

1.4.4.1. MARCADORES TUMORALES Y POLIPÉPTIDOS

CA-125 en suero

CA-125 es un antígeno de la superficie celular hallado en tejidos derivados del epitelio celómico embrionario, entre los que está el

endometrio, y es un marcador útil para controlar el carcinoma ovárico epitelial (Schutter y cols., 2002; Bast y cols., 1983).

En un principio se pensó que CA-125 podría ser un punto de referencia para el diagnóstico de la endometriosis pélvica, ya que desde mediados de los años 80 se conoce la asociación entre niveles elevados en suero de CA-125 y la presencia de endometriosis moderada y severa (Barbieri y cols., 1986), pero su baja sensibilidad ha sido comprobada en los sucesivos estudios.

La principal variable de confusión en la determinación de la sensibilidad y especificidad del CA-125 en suero es el propio estadiaje de la enfermedad. En un meta-análisis basado en 23 estudios (Mol y cols., 1998), de los cuales 16 son estudios de cohortes y 7 estudios caso-control, cuando consideran todos los grados de la enfermedad se obtiene una especificidad del 90% y una sensibilidad de sólo el 28%, similares a los aportados por estudios posteriores (Gagné y cols., 2003), mientras que si sólo considera la endometriosis grado III-IV con una especificidad del 89% la sensibilidad

aumenta hasta un 47%. También concluye que como marcador aislado no está indicado para la detección de pacientes con endometriosis mínima y leve. La baja sensibilidad impide usarlo como prueba diagnóstica al disminuir dramáticamente su valor predictivo positivo, ya que un valor negativo podría retrasar el diagnóstico en un 70% de las pacientes con endometriosis, por lo tanto el CA-125 no puede ser defendido como arma diagnóstica de endometriosis en pacientes con dolor pélvico crónico o esterilidad.

El *cut-off* usado en la mayor parte de los estudios es de 35 U/mL, el utilizado en la detección del cáncer de ovario epitelial. En un reciente estudio (Kitawaki y cols., 2005) propone la disminución del *cut-off* a una combinación de 20 U/mL para el cálculo de VPN y 30U/mL para el cálculo de VPP y así mejorar los resultados tanto en pacientes con endometriomas como en aquellas que no los presentan.

Sin embargo, la monitorización de los niveles de CA-125 desde el momento del diagnóstico, cuando se hallen elevados, puede ser útil para el

seguimiento de la enfermedad y aparición de recidivas, ya que se ha observado la disminución de dichos niveles tras el tratamiento médico y quirúrgico (Pittaway, 1997; Chen y cols., 1998). Aunque los niveles aumentados suprimidos durante el tratamiento médico con frecuencia retornan a las concentraciones anteriores inmediatamente después de interrumpido el tratamiento, lo que limita su utilidad clínica (Franssen y cols., 1992).

Las determinaciones séricas de CA-125 pueden ser útiles para distinguir entre quistes anexiales endometriósicos o no endometriósicos y benignos, en especial cuando se combina con ecografía transvaginal. (Alcázar y cols., 1997; Guerreiro y cols., 1996).

Es importante destacar que los niveles de CA-125 pueden estar aumentados en el principio del embarazo, en la enfermedad inflamatoria pélvica aguda, neoplasia ovárica, miomas y menstruación, por lo que se recomienda hacer la extracción fuera del periodo menstrual (Pittaway y Fayez, 1987; Hornstein y cols., 1992).

CA 19.9 en suero

El CA 19.9 es una glicoproteína de alto peso molecular que se halla elevada en pacientes con tumores ováricos malignos y benignos (Ye y cols., 1994), incluidos los endometriomas (Imai y cols., 1998). Los niveles de CA 19.9 en mujeres con endometriosis disminuyen significativamente tras el tratamiento cuando se comparan con los niveles basales previos (Matalliotakis y cols., 1998).

En un reciente estudio, 34 de 101 pacientes con endometriosis (34%) tuvieron niveles elevados de CA 19.9 (>37 UI/ml) y no se encontraron elevados en ninguna de las 22 pacientes controles (Harada y cols., 2002). El CA 19.9 no estuvo elevado en 38 pacientes con endometriosis I y II pero si lo estuvo en 34 de las 63 pacientes (54%) que presentaban endometriosis grado III y IV. Comparando la sensibilidad del CA 19.9 y CA-125 para el diagnóstico de la endometriosis, los mismos autores encontraron que la sensibilidad del CA 19.9 es significativamente más baja que la del CA-125 (34% y 49% respectivamente). Ensayando un nuevo punto de corte, entre 20

y 25 UI/ml en lugar del 37 UI/ml, la sensibilidad del CA 19.9 podría mejorar sin empeorar la especificidad, el VPP y VPN. Sin embargo, este estudio concluye que la utilidad clínica del CA 19.9 no es superior a la del CA-125.

sICAM-1 en suero

La forma soluble de ICAM-1 es secretada por el endometrio y los implantes endometriósicos (Viganó y cols., 2000), además, el endometrio de mujeres con endometriosis secretan mayor cantidad de esta molécula que el de mujeres sin la enfermedad. Consecuentemente, una fuerte relación existe entre los niveles de sICAM-1 vertidos por el endometrio y el número de implantes endometriósicos en pelvis, pudiendo suponer entonces que el sICAM-1 puede ser útil en el diagnóstico de la endometriosis.

Algunos autores han encontrado un aumento significativo de la concentración de sICAM-1 en suero en pacientes con endometriosis (De Placido y cols., 1998; Wu y cols., 1998; Daniel y cols., 2000; Matalliotakis y cols., 2001).

En un reciente estudio prospectivo de cohortes evaluando la utilidad diagnóstica del sICAM-1 como potencial marcador de la endometriosis en suero, Somigliana y cols. incluyeron una serie de 120 mujeres en edad reproductiva a las que se les practicó una laparoscopia por patología ginecológica benigna. Estos autores sólo encontraron que los niveles de sICAM-1 eran más altos pero no de forma significativa en las mujeres con endometriosis comparadas con las mujeres libres de enfermedad (2002). Sin embargo, en las 21 mujeres que presentaron endometriosis profunda encontraron concentraciones de sICAM-1 significativamente mayores que en las mujeres sin enfermedad y que en las que presentaban endometriosis superficial. Así, la sensibilidad y especificidad del sICAM-1 para el diagnóstico de la endometriosis profunda recogida por estos autores fue de 19% y 97% respectivamente, superior a la presentada por el CA-125 (14% y 92% respectivamente). Cuando los dos marcadores eran usados concomitantemente, la sensibilidad y especificidad era del 28% y 92%, respectivamente, concluyendo que la medida de CA-125 y sICAM-1 puede ser de utilidad para identificar a mujeres con endometriosis profunda infiltrante.

Proteína placentaria 14 en suero

La proteína placentaria 14 en suero (PP14) ha sido encontrada en pacientes con endometriosis significativamente más elevada que en las pacientes control sanas (Telimaa y cols., 1989). Los niveles bajaron significativamente tras la cirugía o el tratamiento médico con danazol y medroxiprogesterona. Su habilidad para el diagnóstico de endometriosis está limitada por su baja sensibilidad (59%).

1.4.4.2. MARCADORES INMUNOLÓGICOS

Citoquinas en suero

Bedaiwy y cols. en 2002 midieron la concentración en sangre y líquido peritoneal de 6 IL distintas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 y TNF- α) en un grupo mujeres que sufrieron laparoscopia por dolor, infertilidad, esterilización tubárica voluntaria. Sólo la IL-6 en sangre y el TNF- α en líquido peritoneal resultaron discriminativos entre pacientes con o sin

endometriosis. La IL-6 en suero presentó un alto valor diagnóstico con un área bajo la curva de 87%. Los autores proponen distintos puntos de corte, 2 pg/ml, 4 pg/ml y 7,5 pg/ml con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 67%; del 85% y 80%; y del 80% y 87% respectivamente. No encuentran que el estadio de la enfermedad afecte a los niveles de IL-6.

Anticuerpos antiendometriales en suero

Algunos investigadores han postulado que los anticuerpos(ac) antiendometriales son una probable causa de infertilidad en pacientes con endometriosis (Weed y cols., 1980; Badawy y cols., 1984) mientras que otros están en desacuerdo con esta hipótesis (Dunselman y cols., 1988b). Además de la inconsistencia en las técnicas usadas en los ensayos (Wild y cols., 1992), la naturaleza de los antígenos usados para obtener una respuesta inmune en dichos estudios los hacen inconsistentes también.

Por otro lado, aunque la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos antiendometriales son equiparables a las del CA-125 (Meek y

cols., 1988; Wild y cols., 1991), esta determinación no se usa en el diagnóstico de la endometriosis, probablemente debido a la disponibilidad de la determinación del CA-125 para el ginecólogo comparado con la del test de los ac. antiendometriales.

Autoanticuerpos para marcadores de estrés oxidativo

En un estudio para medir autoanticuerpos para proteínas modificadas oxidativamente en suero en mujeres diagnosticadas quirúrgicamente de endometriosis, Murphy y cols. (1998) midieron los títulos de distintos autoanticuerpos para marcadores de estrés oxidativo mediante ELISA y los correlacionaron con el estadio de la enfermedad, síntomas y tipo morfológico de lesión. Concluyeron que los niveles se hallaban aumentados significativamente en las mujeres con endometriosis sin correlación con estadio, síntomas o morfología de las lesiones.

1.4.4.3. MARCADORES GENÉTICOS

Dado que la etiología de la endometriosis es compleja y multifactorial, la exploración genómica de la endometriosis abre amplias posibilidades, estando múltiples genes involucrados (Stefansson y cols., 2002). Las distintas técnicas disponibles hacen posible encontrar marcadores genéticos de la enfermedad, que podrían ser utilizados como cribaje (Taylor y cols., 2002b; Vaisse y cols., 1990; Eyster y cols., 2002).

1.4.4.4. MARCADORES EN TEJIDO ENDOMETRIAL

Aromatasa P 450

Esta enzima puede ser expresada tanto en endometrio eutópico como en el ectópico de las pacientes con endometriosis pero no en el endometrio eutópico de las mujeres sanas, pero el potencial uso de la aromatasa P 450 como herramienta diagnóstica de enfermedad pélvica está limitado por la observación de un importante número de mujeres con endometriosis que no

expresan la aromatasa P 450 en su endometrio eutópico (Kitawaki y cols., 1997; 1999).

Receptores hormonales

El estudio de los receptores de estradiol y progesterona en sus distintas isoformas en el endometrio ectópico puede usarse como marcador de actividad de las lesiones endometriósicas (Evers y cols., 1993), pero su determinación en endometrio eutópico para el diagnóstico de endometriosis no parece tener valor.

1.4.5. LAPAROSCOPIA

Dado que ninguna de las herramientas diagnósticas mencionadas hasta el momento nos permite el diagnóstico de la endometriosis mínima y leve, ni la valoración del verdadero alcance de la enfermedad en las pacientes con endometriomas, el diagnóstico de la enfermedad requiere la confirmación mediante la visualización directa y/o la biopsia de las lesiones.

Por ello, la laparoscopia representa el *gold standard* para el diagnóstico de la endometriosis.

La laparoscopia nos permite visualizar y magnificar toda la pelvis y al finalizar la exploración endoscópica debe recogerse en un diagrama apropiado la localización, el tipo y la extensión de las lesiones para establecer el estadio de la enfermedad de acuerdo con alguna de las múltiples clasificaciones propuestas. En el momento actual, la más utilizada es la Clasificación Revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 1997) que incluye cuatro estadios (del I al IV) correspondiendo los estadios III y IV a los casos más extensos y severos de la endometriosis (fig. 2).

Actualmente, el diagnóstico de endometriosis se lleva a cabo, la mayoría de las veces, por la visualización directa de las lesiones sin biopsiarlas, como se describe en algunos estudios (Gagné y cols., 2003; Marcoux y cols., 1997), lo que puede llevar a errores por la gran variedad de lesiones, profundidad y localización. Errores que nos pueden llevar a un

sobrediagnóstico de la enfermedad, ya que sólo del 62% al 87% de los casos diagnosticados por cirugía fueron confirmados por las biopsias tomadas en diferentes estudios (Walter y cols., 2001; Stratton y cols., 2003), o bien a una estimación de la extensión de la endometriosis equivocada, asignándoles por diagnóstico visual estadios superiores a los que realmente padecen (Walter y cols., 2001). La correspondencia entre las biopsias tomadas y el resultado anatomopatológico positivo para endometriosis es entre un 48,5% (Walter y cols., 2001) y un 67% (Stratton y cols., 2003), siendo las lesiones pequeñas (menores de 1 centímetro de diámetro y con menos de 1 centímetro de profundidad) y los defectos peritoneales los que menos probabilidad tienen de ser histológicamente positivos (Stratton y cols., 2003). Así, una histología positiva confirma el diagnóstico de endometriosis; pero una histología negativa no lo excluye. Si estamos delante de una endometriosis únicamente peritoneal la obtención de una biopsia está todavía en debate: la inspección visual es habitualmente adecuada pero la confirmación histológica de al menos una lesión sería lo ideal (Kennedy y cols., 2005).



SOCIEDAD AMERICANA SOCIETY PARA MEDICINA REPRODUCTIVA CLASIFICACION REVISTA DE ENDOMETRIOSIS

Nombre paciente _____ Fecha _____
 Grado I (Minimal) - 1-5 Laparoscopia _____ Laparotomia _____ Fotografía _____
 Grado II (Hold) - 6-15 Tratamiento recomendado _____
 Grado III (Moderate) - 16-40 Pronóstico _____
 Grado IV (Severe) - >40
 Total _____

PERTONEO	ENDOMETRIOSIS	< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
	Superficial	1	2	4
OVARIO	Profundo	2	4	6
	D Superficial	1	2	4
	Profundo	4	16	20
	I Superficial	1	2	4
POSTERIOR SACO DE DOUGLAS OBLITERACION		< Parcial	Completo	
		4	40	
OVARIO	ADHESIONES	< 1/2 Cierre	1/2-3/4 Cierre	> 3/4 Cierre
	D Transparente	1	2	4
	Opaco	2	8	16
	I Transparente	1	2	4
TROMPA	Opaco	4*	8*	16
	D Transparente	1	2	4
	Opaco	4*	8*	16
	I Transparente	1	2	4
TROMPA	Opaco	4*	8*	16

*Si las fimbrias de las trompas de falopio están completamente adheridas, se cambia el punto asignado a 16.
 Indicar la aparición de implantes superficiales tipo rojo[(R), rojo, rojo-rosa, tipo llama, gota vesicular, vesículas claras], blancas [(W), opacificaciones, defectos peritoneales, amarillo-marrón], o negros [(B) negros, depósitos de hemosiderinas, azul]. Indicar el porcentaje total descrito como R ____% B ____% and N ____%. El total debe ser igual al 100%.

Endometriosis Adicional: _____
 Patología asociada: _____



Figura 2. Clasificación Revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva para estadiaje de la endometriosis. 1996.

A la luz de lo expuesto en la introducción podemos afirmar que la endometriosis sigue siendo un rompecabezas en el que la inmunidad desempeña un papel importante y de la que no poseemos un diagnóstico no invasivo de la endometriosis mínima – leve; con este estudio nos proponemos intentar discernir el papel de una de sus piezas, la IL-6

Con toda esta información estamos en disposición de formular la hipótesis y los objetivos que pasamos a describir a continuación.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Dado que:

1. Existe evidencia de la influencia de la alteración del sistema inmune en la patogenia de la endometriosis.
2. La IL-6 se halla aumentada en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis.
3. La detección de IL-6 en suero es posible.
4. No existe ningún método no invasivo para la detección de endometriosis peritoneal.

La hipótesis de que partimos es la existencia de un aumento en suero de los niveles de IL-6 en las pacientes con endometriosis en comparación con pacientes sanas. Nos planteamos que estas diferencias deben existir también con pacientes que presenten otras patologías ginecológicas benignas.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar el papel de la IL-6 en suero en el diagnóstico no invasivo de la endometriosis en cualquiera de sus grados, estableciendo el nivel de corte de IL-6 en sangre que nos proporcione una sensibilidad y especificidad adecuadas para su diagnóstico.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a. Comparación de la IL-6 con el CA-125, como marcador bioquímico más ampliamente empleado en el diagnóstico de la endometriosis.
- b. Valorar la influencia de otras patologías ginecológicas en los niveles de IL-6 en suero.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo es estudio OBSERVACIONAL PROSPECTIVO, de CASOS- CONTROLES.

Las pacientes procedían de la lista de espera quirúrgica de laparoscopia del Hospital Universitario Dr. Peset por distintas indicaciones: esterilización tubárica voluntaria, estudio de esterilidad, patología uterina, patología anexial o algias pélvicas.

Para su selección utilizamos los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Edad reproductiva con ciclos menstruales regulares.

Criterios de exclusión:

- Haber recibido cualquier tipo de tratamiento hormonal que pudiese influir en la evolución de la endometriosis en los tres meses previos a la extracción de la muestra de sangre: anticonceptivos hormonales, análogos de la GnRH, progestágenos y Danazol (Kennedy y cols., 2005).
- La existencia de otros procesos que pudiesen aumentar los niveles de IL-6 en sangre en el momento de la extracción, como infecciones agudas, procesos inflamatorios crónicos, procesos neoplásicos.
- La presencia de dos o más patologías concomitantes en la laparoscopia.

La recogida de la muestra de sangre se realizó de forma preoperatoria. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes.

Se seleccionaron 128 pacientes que reunieron, en principio, los criterios de selección en el periodo de tiempo transcurrido entre Febrero del

2003 a Febrero del 2005. De ellas, a 4 no se les realizó la laparoscopia por motivos personales, sus indicaciones eran 2 por ligadura tubárica, 1 por esterilidad de origen desconocido y 1 por mioma, esta última por quedar gestante antes de la fecha de la intervención.

La laparoscopia se realizó según la técnica habitual, obteniendo en todos los casos biopsias de todas las lesiones para su posterior análisis histológico.

Tras la práctica de la laparoscopia 5 de las pacientes tuvieron que ser excluidas del estudio, 2 por presentar proceso adherencial secundario a una enfermedad inflamatoria pélvica y las 3 restantes por presentar dos patologías concomitantes, en dos casos endometriosis peritoneal + miomas uterinos y en el tercero un teratoma + focos de endometriosis peritoneal.

Según los hallazgos operatorios y el resultado de las biopsias obtenidas, las 119 pacientes restantes quedaron distribuidas en los siguientes grupos, como se muestra en la figura 3.

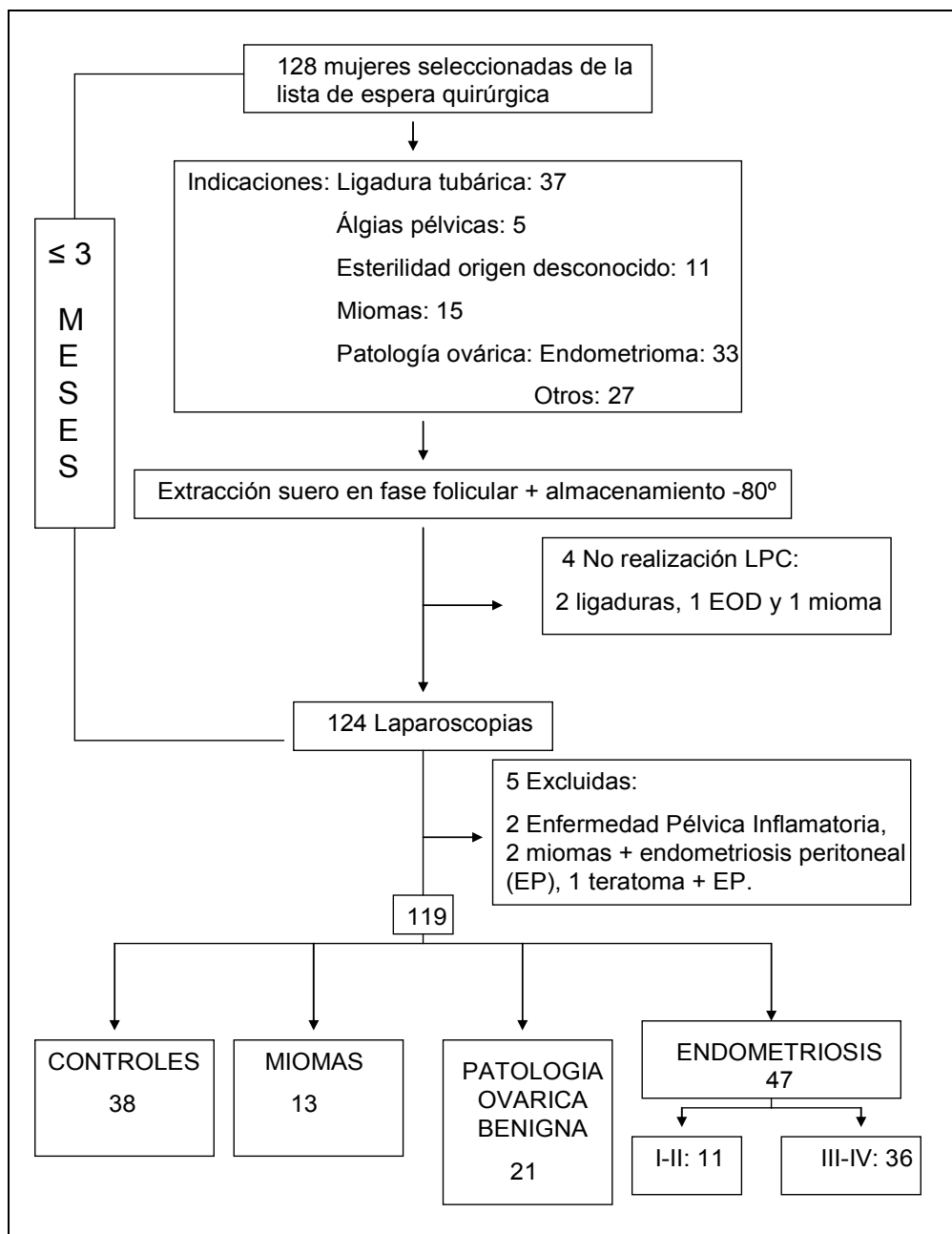


Figura 3: Diseño de estudio.

- a) **Grupo control:** formado por 38 mujeres que no presentaban hallazgo patológico alguno, con una edad media (\pm ES) de $35,5 \pm 1,1$, oscilando entre 17 y 44 años. El IMC medio es de $24,4 \pm 0,4$.
- b) **Patología uterina:** constituido por 13 pacientes que presentaban miomas uterinos, cuya edad media es de $36,3 \pm 1,2$ años (29-46 años), con un IMC de $25,3 \pm 0,9$. El tamaño medio de los miomas fue de 4,2 cm (3-7 cm), sin que se objetivase en la anatomía patológica componente adenomiosico.
- c) **Patología ovárica:** quedó constituido por 21 pacientes con patología anexial benigna distinta a la endometriosis, los diagnósticos fueron los que se describen a continuación: quiste simple (6 casos), teratoma (7 casos), cistoadenoma seroso (1 casos), fibroma ovárico (1 caso), ovarios poliquísticos (1 caso) y quiste de paraovario (5 casos). En este grupo la edad media es de $29,8 \pm 1,6$ años (18-45 años) y el IMC de $24,6 \pm 0,9$.

- d) Endometriosis:** que a su vez dividimos en dos subgrupos según el grado de severidad de la patología de acuerdo con la Clasificación Revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, (1997). Formado por 47 pacientes con edad media de $33,8 \pm 1,1$ años (19-46 años) e IMC de $23,2 \pm 0,5$. Fueron 6 casos de endometriosis I o mínima, 5 casos de endometriosis II o leve, 24 casos de endometriosis III o moderada y 12 casos de endometriosis IV o grave. Los subgrupos de estudio quedan constituido por:
- **Endometriosis I - II:** 11 pacientes.
 - **Endometriosis III - IV:** 36 pacientes.

4.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

La extracción de sangre se realizó dentro de los tres meses previos a la intervención quirúrgica.

Dado que en la literatura existe controversia sobre si el momento del ciclo menstrual influye en los valores de IL-6 en suero (Tabibzadeh y cols., 1989; Pellicer y cols., 1998; Angstwurm y cols., 1997; Schwarz y cols., 2000) elegimos realizar la extracción de sangre en la fase proliferativa del ciclo, entre los días 5 y 12, en todas las pacientes para evitar sesgos. La fase menstrual se determinó por la fecha de la última regla previa a la extracción de la muestra.

En la muestra obtenida de cada paciente se determinó aparte de las variables a estudio, CA-125 y IL-6, la cuantificación de VSG como marcador de proceso inflamatorio activo.

La muestra de sangre fue obtenida de forma aséptica en tubos estériles con separador (SST®) de 5 ml. La sangre recogida se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos y se separó el suero claro sobrenadante.

El suero se congeló a -80°C para la posterior determinación de IL-6 y CA-125.

4.2.1. DETERMINACIÓN DE IL-6

La determinación de IL-6 en suero fue realizada mediante ELISA (Quantikine, R & D Systems Inc, Minneapolis, USA).

Los niveles obtenidos de IL-6 se expresaron en pg/ml.

Los coeficientes de variación de interensayo e intraensayo fueron 6,4 y 4,2 % respectivamente.

El límite de detección del ensayo fue 0,7 pg/ml.

4.2.2. DETERMINACIÓN DE CA-125

La determinación de CA-125 en suero se realizó por inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas usando el ensayo ARCHITECT CA-125 II (Abbott, USA).

Los niveles obtenidos de CA-125 se expresaron en U/ml.

El límite de detección del ensayo ARCHITECT CA-125 II fue $< 1,0$ U/ml.

El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue $\leq 10\%$.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron en medias \pm desviación estándar (DE). También, el diagrama de cajas ha sido usado para mostrar las características epidemiológicas de los grupos de estudio empleando medianas. El análisis de varianza (ANOVA) fue utilizado para comparar los distintos grupos de estudio cuando las variables eran categóricas. El test de Bonferroni se aplicó cuando el ANOVA detectó diferencias significativas. Cuando la homogeneidad y normalidad de las muestras no fue apropiada (Kolgomorov-Smirnov), los tests estadísticos no paramétricos, Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, fueron empleados para la comparación de los distintos grupos. Se definió la significancia estadística como $p < 0,05$.

Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de dos características: la sensibilidad y la especificidad. Sin embargo, estas varían en función del criterio elegido como punto de corte entre la población sana y enferma. La Curva ROC o curva de rendimiento diagnóstico es un gráfico que nos proporciona el espectro completo de pares

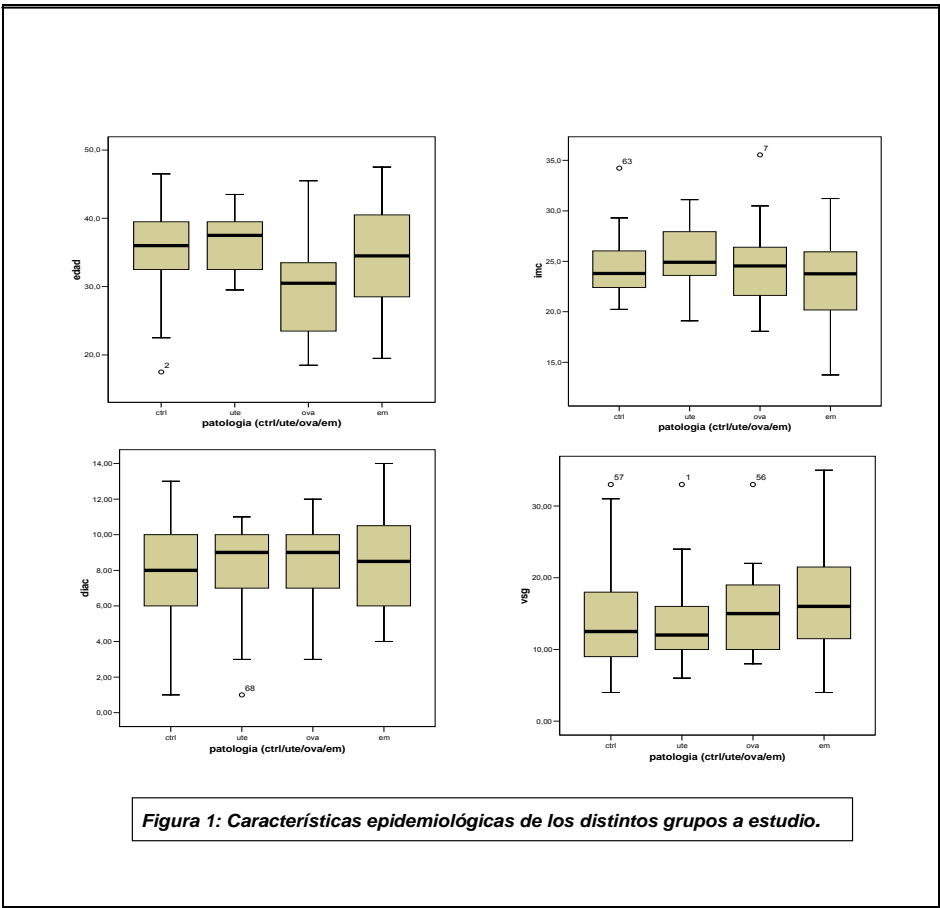
de sensibilidad/especificidad para todos los puntos de corte resultantes de la variación continua de los resultados observados. De esta forma describe la exactitud de la prueba para discriminar entre dos estados alternativos de salud, siendo una herramienta fundamental para la evaluación y comparación de pruebas diagnósticas. La evaluación cuantitativa de la exactitud se realiza mediante el área bajo la curva (ABC) ROC, que se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos sano y enfermo, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarle la prueba diagnóstica (Burgueño y cols., 1995). La determinación de un *cut-off*, su sensibilidad y especificidad han sido calculadas con las curvas ROC, siendo el área bajo la curva aproximadamente el porcentaje correctamente clasificado si el test es usado como herramienta diagnóstica.

El análisis estadístico se ha hecho usando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 12.0 Inc., Chicago, Ill).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. COMPARACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LOS GRUPOS



Como se aprecia en la figura 1 no existen diferencias significativas entre los grupos a estudiar – grupo control, patología uterina, patología ovárica y endometriosis – en cuanto a la edad de las pacientes, IMC, día del ciclo en el que se determinan las variables a estudiar ni VSG.

5.2. RESULTADOS DE IL-6 EN SUERO

Los niveles medios de IL-6 en suero de las pacientes con endometriosis en general no presentan diferencias significativas con el resto de grupos, pero al considerar por separado la endometriosis I-II de la III-IV observamos que las pacientes que presentan estadios mínimos y leves tienen niveles más altos de IL-6 ($p < 0,05$). No existen diferencias significativas entre las pacientes que no presentan endometriosis (Tabla 1).

Tabla 1: Niveles de IL-6 comparando grupo control, patología uterina, patología ovárica benigna y endometriosis, global y por estadios.

	Control		Mioma		Patología ovárica		Endometriosis		Endometriosis I-II		Endometriosis III-IV		P [†]
	n	media ± DE mediana (rango) [*]	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	
IL-6 (pg/ml)	38	15,7 ± 9,3 ^a 14,1 (8,4-20,8)	13	21,7 ± 17,6 ^b 18,2 (10,8-25,0)	21	19,3 ± 12,2 ^c 15,6 (10,1-25,2)	47	19,7 ± 11,0 ^d 19,4 (16,4-23,1)	11	29,4 ± 9,0 ^{a, b, c, e} 28,4 (21,4-37,3)	36	17,6 ± 10,3 ^e 17,5 (9,3-24,1)	0,019

[†] El test de Kruskal-Wallis ha sido usado para la comparación de todos los grupos; el test de Mann-Whitney ha sido usado para las comparaciones de parejas.

a p=0,002; b p=0,036; c p=0,008; d p=0,007; e p=0,005.

DE =desviación estándar; *rango = rango intercuartil (percentiles 25-75)

Como se muestra en la tabla 2, al reagrupar las pacientes sin endometriosis (n=72) observamos que los niveles de IL-6 se encuentran elevados de forma significativa en las pacientes con endometriosis I-II comparándolos tanto con las pacientes con endometriosis III-VI (p=0,005) como con las que no sufren endometriosis (p=0,002).

Tabla 2. Niveles de IL-6 comparados en pacientes sin endometriosis, con endometriosis I-II y endometriosis III-IV.

	No endometriosis			Endometriosis I-II			Endometriosis III-IV			<i>P</i> [†]
	n	media ± DE	mediana (rango)*	n	media ± DE	mediana (*)	n	media ± DE	mediana (*)	
IL-6 (pg/ml)	72	17,8 ± 12,1 ^a	15,1 (9,8 – 23,8)	11	29,4 ± 9,0 ^{a, b}	28,4 (21,4 – 37,3)	36	17,6 ± 10,3 ^b	17,5 (9,3 – 24,1)	0,008

[†] El test de Kruskal-Wallis ha sido empleado para las comparaciones globales; posteriormente se ha aplicado el test de Mann-Whitney para las comparaciones por parejas.

a *p*=0,002; b *p*=0,005.

DE =desviación estándar; *rango = rango intercuartil (percentiles 25-75)

5.3. RESULTADOS DE CA-125 EN SUERO

La media de CA-125 en suero de las pacientes con endometriosis es superior de forma significativa al compararla tanto con la del grupo control como con las pacientes con patología ovárica benigna y uterina, $p < 0,001$, $p = 0,001$ y $p = 0,011$ respectivamente.

Al distinguir entre endometriosis grado I-II y grado III-IV se pone de manifiesto que es únicamente el grupo de endometriosis III-IV el que presenta diferencias significativas con la totalidad de los grupos, incluido el de endometriosis I-II ($p = 0,005$). Mientras que los niveles obtenidos en el grupo de endometriosis I-II no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos. No hay diferencias significativas entre las pacientes que no presentan endometriosis (Tabla 1).

Tabla 1: Niveles de CA-125 (UI/ml) comparando grupo control, patología uterina, patología ovárica benigna y endometriosis, global y por estadios.

	Control		Mioma		Patología ovárica		Endometriosis		Endometriosis I-II		Endometriosis III-IV		P†
	n	media ± DE mediana (rango*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	
CA-125	38	15,5 ± 12,17 ^{a, d} 13,1 (9,0-17,8)	13	16,9 ± 10,6 ^{b, e} 14,5 (9,7-22,0)	21	16,1 ± 7,9 ^{c, f} 14,0 (9,9-23,3)	47	44,8 ± 52,7 ^{a, b} 25,4 (14,0-62,2)	11	15,3 ± 6,1 ^g 14,5 (9,2-21,3)	36	51,3 ± 56,3 ^{a, e, f, g} 31,5 (16,0-65,0)	<0,001

†El test de Kruskal-Wallis ha sido usado para la comparación de todos los grupos; el test de Mann-Whitney ha sido usado para las comparaciones de parejas.

a p<0,001; b p=0,001; c p=0,011; d p<0,001; e p=0,002; f p<0,001; g p=0,005.

DE =desviación estándar; *rango = rango intercuartil (percentiles 25-75)

Como se muestra en la tabla 2, al reagrupar las pacientes sin endometriosis (n=72) observamos que los niveles de CA-125 se encuentran elevados de forma significativa en las pacientes con endometriosis III-IV comparándolos tanto con las pacientes con endometriosis I-II ($p=0,005$) como con las que están libres de la enfermedad ($p<0,001$).

Tabla 2. Niveles de CA 125 comparados en pacientes sin endometriosis, con endometriosis I-II y endometriosis III-IV.

	No endometriosis		Endometriosis I-II		Endometriosis III-IV		<i>P</i> [†]
	n	media ± DE mediana (rango)*	n	media ± DE mediana (*)	n	media ± DE mediana (*)	
CA-125 (IU/ml)	72	15,9 ± 10,6 ^a 14,0 (9,7 – 19,1)	11	15,3 ± 6,1 ^b 14.5 (9,6 – 21,3)	36	51,3 ± 56,3 ^{a, b} 31,5 (16,0 – 65,0)	<0,001

[†] El test de Kruskal-Wallis ha sido empleado para las comparaciones globales; posteriormente se ha aplicado el test de Mann-Whitney para las comparaciones por parejas.

^a $p<0,001$; ^b $p=0,005$.

DE =desviación estándar; *rango = rango intercuartil (percentiles 25-75)

5.4. VALOR DIAGNÓSTICO

A la vista de los resultados obtenidos con el análisis de las medias de cada una de las variables estudiadas reagrupamos de distintas maneras los grupos de pacientes para poder valorar como obtendríamos el mayor rendimiento de dichas variables.

Examinaremos los resultados considerando:

- I. ENDOMETRIOSIS / NO ENDOMETRIOSIS.
- II. ENDOMETRIOSIS GRAVE (III-IV) / NO ENDOMETRIOSIS GRAVE.
- III. ENDOMETRIOSIS LEVE (I-II) / NO ENDOMETRIOSIS LEVE.

5.4.1. GRUPOS DE ESTUDIO: ENDOMETRIOSIS VS. NO ENDOMETRIOSIS

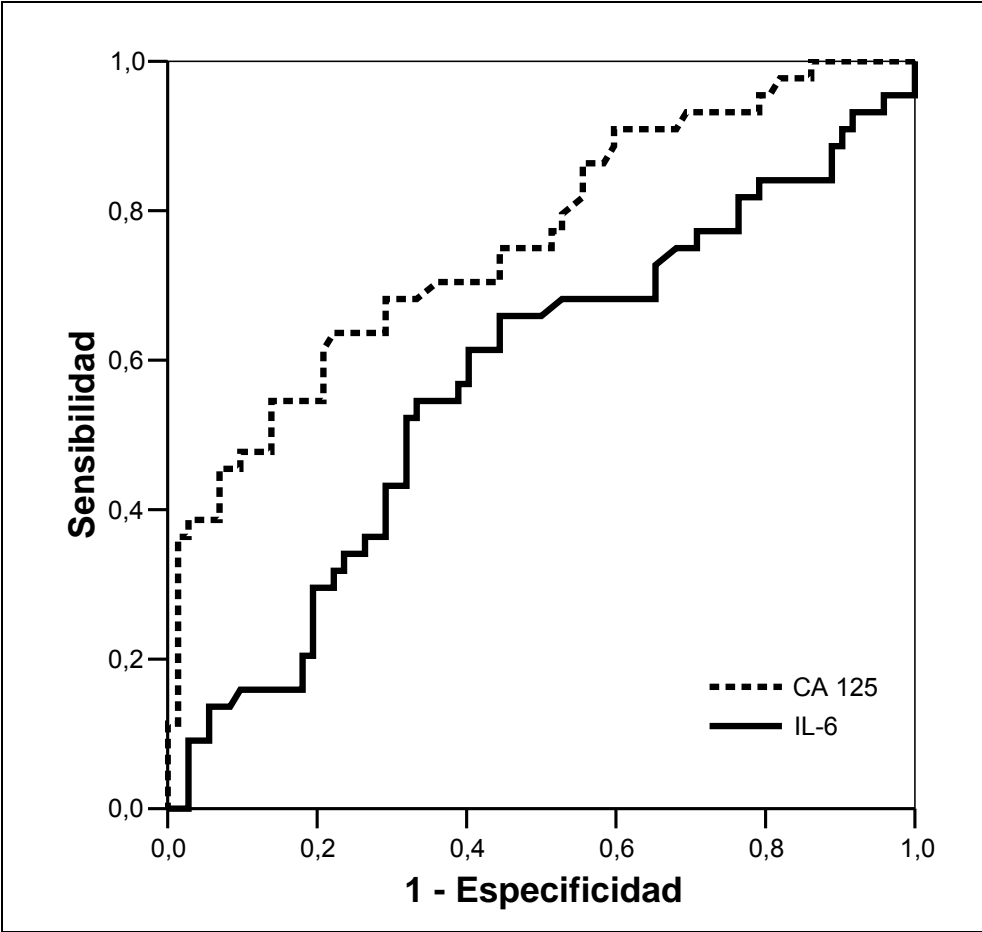
CURVAS ROC:

Las áreas obtenidas se representan en la tabla 1. El CA-125 es una buena herramienta diagnóstica para el diagnóstico de la endometriosis. La IL-6, a pesar de tener un ABC superior a 0,5, tendría una exactitud diagnóstica baja.

Tabla 1: Área bajo la curva para diagnóstico de endometriosis.

Resultado test Variable(s)	ABC	EE	Significancia	Intervalo Confianza 95%	
				Inferior	Superior
CA-125	0,759	0,047	0,000	0,668	0,851
IL-6	0,572	0,056	0,192	0,463	0,682

EE: error estándar.



CA-125 en Endometriosis

Área bajo la curva: $ABC = 0,75915$ (95% IC: 0,67095 a 0,83368).

Si aplicamos el punto de corte usado en la clínica diaria de 35 U/ml obtenemos para nuestra casuística una sensibilidad del 38%, especificidad del 97%, VPP del 60% y VPN del 93%.

IL- 6 en Endometriosis

Área bajo la curva: $ABC = 0,57244$ (95% IC: 0,47724 a 0,66386), el intervalo de confianza incluye el 0,5 por lo cual la prueba no es capaz de discernir entre enfermos y sanos.

5.4.2. GRUPO DE ESTUDIO: ENDOMETRIOSIS GRAVE VS. NO ENDOMETRIOSIS GRAVE

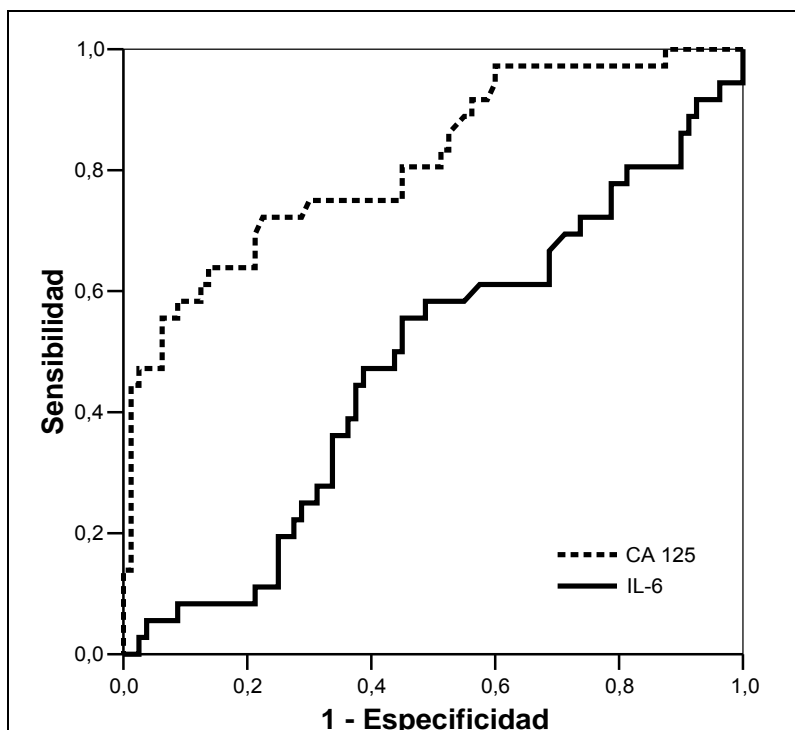
CURVAS ROC:

Tabla 2: Área bajo la curva para el diagnóstico de endometriosis grave

Resultado test Variable(s)	ABC	EE	Significancia	Intervalo Confianza 95%	
				Inferior	Superior
CA-125	0,813	0,045	0,000	0,725	0,900
IL-6	0,481	0,058	0,743	0,367	0,595

EE: error estándar.

Como se aprecia en la tabla 2, de nuevo el CA-125 presenta un ABC superior a la hipótesis nula (ABC de 0,5) y se mejora el ABC al considerar sólo los grados avanzados de la enfermedad. La IL-6 no tiene ningún valor diagnóstico ya que su área es menor de 0,5.



CA-125 en Endometriosis III - IV

Área bajo la curva: ABC= 0,81267 (95% IC: 0,72965 a 0,87910)

De igual forma, al considerar el punto de corte de 35 U/ml para el diagnóstico de endometriosis grave se observa un aumento de la sensibilidad, VPP y VPN (47%, 67% y 94% respectivamente), sin variaciones en la especificidad (97%).

5.4.3. GRUPOS DE ESTUDIO: ENDOMETRIOSIS LEVE VS. NO ENDOMETRIOSIS LEVE

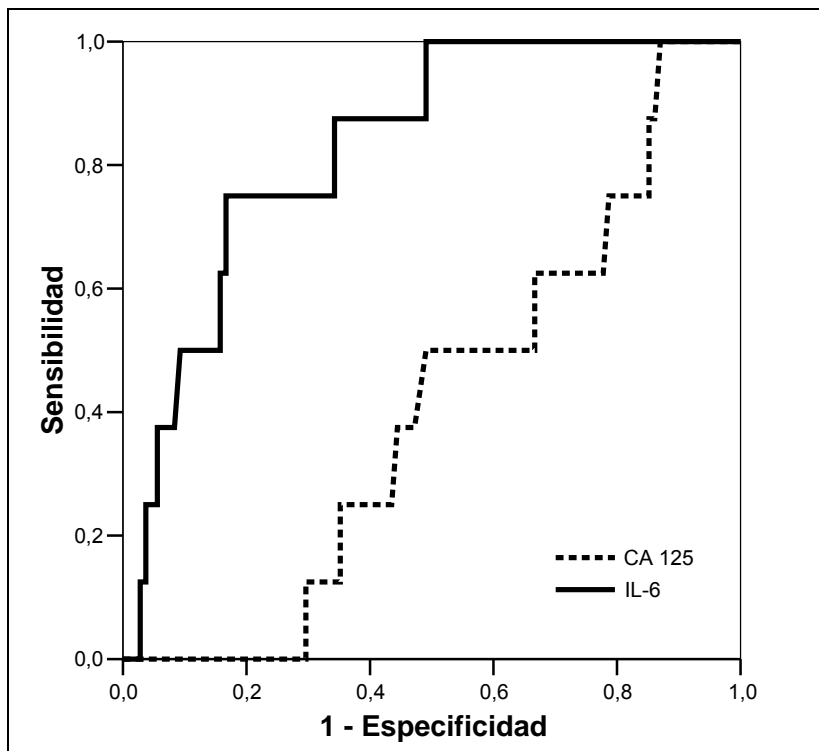
CURVAS ROC:

Al valorar qué prueba diagnóstica es la que nos puede discriminar la existencia de endometriosis leve, únicamente la IL-6 presenta un área bajo la curva estadísticamente significativa de 0,829 ($p=0,002$) con un intervalo de confianza adecuado, al no incluir el 0,5 (Tabla 3).

Tabla 3: Área bajo la curva para el diagnóstico de endometriosis leve

Resultado test Variable(s)	ABC	EE	Significancia	Intervalo Confianza 95%	
				Inferior	Superior
CA-125	0,408	0,083	0,386	0,245	0,571
IL-6	0,829	0,060	0,002	0,712	0,947

EE: error estándar



IL-6 en Endometriosis I – II

Área bajo la curva: ABC= 0,82928 (95% IC: 0,74827 a 0,89277)

Considerando todos los puntos de corte que nos ofrece la curva ROC para la IL-6 seleccionamos 25,75 pg/ml como el más adecuado por mayor rendimiento diagnóstico con una efectividad del 82,8%, que nos ofrece una

sensibilidad del 75,0%, especificidad del 83,3%, VPP del 65,8% y VPN del 88,6%.

Mientras que los puntos de corte 20 y 35 pg/ml nos permitirían conseguir mejores resultados predictivos para endometriosis mínima y leve (Tabla 4).

<i>Tabla 4. Rendimiento de la concentración de IL-6 en suero para la identificación de presencia de endometriosis mínima y leve.</i>				
Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
20 pg/ml	87,5	65,7	52,3	92,5
25,75 pg/ml	75,0	83,3	65,8	88,6
35 pg/ml	37,5	94,4	74,3	77,9
<hr/>				
Valores expresados en porcentaje				
VPP = valor predictivo positivo				
VPN = valor predictivo negativo				
Valores calculados con una prevalencia de endometriosis del 30%.				

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los resultados podrían sugerir una nueva herramienta diagnóstica para identificar a las pacientes que sufren una endometriosis mínima o leve, basada en la detección de IL-6 en suero.

Actualmente el estándar de oro para el diagnóstico de la endometriosis es la visualización de las lesiones endometriósicas a través de la cirugía. Sin embargo, se trata de un método invasivo y caro, debido a estas limitaciones el diagnóstico laparoscópico llega a las pacientes con un retraso de varios años, entre 3,5 y 11 (Hadfiel y cols., 1996; Brosens y Brosens, 2000), tras el inicio de los síntomas relativos a la endometriosis, como dolor crónico o infertilidad. Por este motivo, es esencial encontrar métodos diagnósticos que sean fiables y accesibles pero sobretodo menos lesivos.

En la práctica diaria, la endometriosis severa puede ser diagnosticada por una exploración ginecológica realizada por un ginecólogo

experimentado. La ecografía transvaginal, que se practica de forma rutinaria en la consulta, detecta endometriosis asociada a endometrioma con una alta sensibilidad y especificidad (Guerreiro y cols., 1998, Patel y cols., 1999; Dessole y cols., 2003). La RNM también detecta endometriomas con una alta precisión (Takahashi, y cols., 1996; Stratton y cols., 2003), pero a pesar de las mejoras técnicas para obtener mejor calidad en la imagen no se ha conseguido una sensibilidad suficiente para detectar los implantes peritoneales. Recientemente, Ezkenazi y cols. han desarrollado un modelo predictivo para la endometriosis basado marcadores no invasivos como la sintomatología, la exploración pélvica y la ecografía transvaginal (2001). Este modelo puede detectar el 85% de las pacientes que sufran endometriosis ovárica pero, al igual que el resto de técnicas de imagen, no tiene la sensibilidad suficiente para la detección de endometriosis leve asociada con implantes peritoneales pero no con endometriomas.

Numerosos marcadores séricos y tisulares han sido propuestos como candidatos para el diagnóstico de endometriosis (Kitawaki y cols., 1999; Bedaiwy y cols., 2002, 2004; Gagné y cols., 2003).

El CA-125 en suero, hasta ahora el único establecido en la práctica clínica, ha sido el más ampliamente estudiado. Es una 200.000 glicoproteína típicamente expresada en los tejidos fetales y que desaparece en adultos. Se ha encontrado elevada en varias patologías ginecológicas benignas y malignas, particularmente si la inflamación y adherencias están presentes, incluida la endometriosis (Kabawat y cols., 1983).

Así, niveles elevados de CA-125 son encontrados a menudo en pacientes con endometriosis avanzada (Pittaway y cols., 1997). Aunque este marcador detecta la endometriosis con una alta especificidad, nos ofrece una sensibilidad muy baja. Además, no está indicado para la detección de pacientes con endometriosis mínima o leve (Mol y cols., 1998). Por esta razón, el CA-125 se emplea habitualmente como marcador de recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento (Pittaway y cols., 1997; Chen y cols., 1998).

El clásico punto de corte de 35 UI/ml, establecido para la detección del cáncer de ovario epitelial (Bast y cols., 1983), ha sido empleado en la

mayor parte de los estudios, incluido en el presente. Los datos que hemos obtenido en cuanto a sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de endometriosis son similares a los descritos en la literatura, de un 38% y 97% respectivamente (Mol y cols., 1998; Gagné y cols., 2003), mientras que si sólo consideramos los casos de endometriosis moderada y grave la sensibilidad asciende a un 47% sin cambios en la especificidad, al disminuir el número de falsos negativos que suponían la endometriosis mínima y leve, que en nuestro estudio presentan niveles similares a los controles. Con todo esto, podemos considerar como la principal variable de confusión en la determinación de la sensibilidad y especificidad del CA-125 en suero el propio estadio de la enfermedad.

Recientemente, Kitawaki y cols. (2005) muestran que aunque la precisión diagnóstica para la endometriosis sin endometriomas es menor que para la endometriosis con endometriomas, el área bajo la curva ROC para endometriosis leve es de 0,788, estableciendo 20 y 30 mU/ml como valores de punto de corte para cribaje de estadios precoces de la enfermedad. A la luz de esta publicación, el papel de CA-125 en el diagnóstico de la

endometriosis I – II debería de ser reevaluado, aunque en nuestro estudio el CA-125 no tiene ningún valor adicional en el diagnóstico de la endometriosis peritoneal.

Un mejor conocimiento de los mecanismos que subyacen en el desarrollo de las lesiones endometriósicas nos ayuda a identificar marcadores apropiados para el diagnóstico de la endometriosis. La implantación de las células endometriales y su desarrollo a lesiones endometriósicas se ha ligado a varios factores, tales como un ambiente peritoneal propicio y una respuesta inmunológica alterada a estas células. También existen evidencias de que las células endometriales eutópicas de pacientes con endometriosis tienen varias propiedades intrínsecas que promueven su desarrollo a lesiones endometriósicas (Kittawaki y cols., 1999; Sugawara y cols., 1997; Sharpe-Timms y cols., 2000; Sillem y cols., 2001; Chung y cols., 2001; Dmowski y cols. 2001; Tseng y cols., 1996; McLaren y cols., 1997).

La IL-6 es uno de los factores que se han hallado alterados en líquido peritoneal en pacientes con endometriosis (Punnonen y cols., 1996; Harada y cols., 1997; Mahnek y cols., 2000; Rier y cols., 1995; Cheong y cols., 2002; Khan y cols., 2002). Su determinación en suero ha sido también evaluada en distintos estudios (Bedaiwy y cols., 2002; Pellicer y cols., 1998; Somigliana y cols., 2004; Iwabe y cols., 2003; Daraï y cols., 2003) y fue el objeto de nuestro estudio.

En nuestro estudio, las pacientes con endometriosis mínima y leve fueron las únicas que presentaron una concentración media elevada de IL-6 en suero, $29,4 \pm 9,0$ (media \pm desviación estándar) al compararlas con las pacientes sin endometriosis ($17,8 \pm 12,1$) y con endometriosis grado III – IV ($17,6 \pm 10,3$), de forma significativa, $p=0,002$ y $p=0,005$ respectivamente.

Los niveles de IL-6 en endometriosis mínima y leve observados en nuestro estudio concuerdan con otros (Bedaiwy y cols., 2002), pero no con el publicado por Somigliana y cols., 2004, en el que no encontraron ningún valor a la IL-6 en el diagnóstico de la endometriosis. También están en clara

oposición otras publicaciones que aportan IL-6 en suero elevado en endometriomas cuando las comparan con otros quistes ováricos benignos (Daraï y cols., 2003; Iwabe y cols., 2003).

El primer punto que debería ser analizado críticamente es la selección de pacientes. En nuestro estudio se evitó la coexistencia de otro proceso inflamatorio en el momento de la obtención de la muestra de sangre. Este fue el motivo de determinar la VSG como marcador de proceso inflamatorio y fue encontrado similar entre los grupos. El mejor estudio publicado (Somigliana y cols., 2004), metodológicamente hablando, desafortunadamente contradice los datos obtenidos por nuestro estudio. Ellos incluyeron 35 pacientes en el grupo control, pero 6 de ellos (17%) tenían una enfermedad inflamatoria pélvica. Por este motivo, estos casos deberían haberse excluido (o analizado en un diferente subgrupo) cuando estamos considerando un marcador de inflamación como lo son las citoquinas.

El segundo punto en el que nos debemos de detener es el estadio de la enfermedad. En el primer artículo que encontramos en la literatura de elevación de los niveles de IL-6 en suero en mujeres con endometriosis no distinguen el estadiaje de la enfermedad (Pellicer y cols., 1998). Las siguientes publicaciones indican que la IL-6 podría estar elevada sólo en presencia de endometriomas (Daraï y cols., 2003; Iwabe y cols., 2003), y otros autores que observan diferencias entre mujeres con o sin endometriosis no las encuentran entre los distintos estadios de la enfermedad (Bedaiwy y cols., 2002), sin que se presenten los datos en el artículo.

La dificultad está en explicar por que estadios precoces de la endometriosis producen una mayor secreción de marcadores de inflamación que los avanzados. En este sentido podríamos tener en cuenta dos aspectos. Primero, Haney y cols. (1991) mostraron una relación inversa entre el número total de macrófagos peritoneales y la extensión de la endometriosis pélvica. Asimismo, la citotoxicidad de estos macrófagos está disminuida en pacientes con endometriosis severa en comparación con endometriosis leve

y/o controles fértiles (Braun y cols., 1992). Ishimaru y cols. (1994) demostraron que la existencia de endometriomas ováricos no supone un aumento de actividad de los macrófagos y niveles de citoquinas en el líquido peritoneal. A su vez, Khan y cols. (2002) mostraron que estadios precoces y lesiones endometriósicas rojas representan los estadios más activos de la enfermedad, produciendo una fuerte reacción inflamatoria pélvica con el consecuente acúmulo de citoquinas en el líquido peritoneal, entre ellas de IL-6. Estos datos podrían apoyar el concepto de que la respuesta inflamatoria puede observarse en estadios precoces y no en los avanzados. Segundo, la posibilidad de que estados precoces y avanzados de la endometriosis sean entidades patológicas distintas o al menos tengan orígenes diferentes. Un reciente estudio propone que los tres tipos de lesiones endometriósicas – peritoneal, ovárica y rectovaginal – deberían ser consideradas como entidades separadas, cada una con diferente patogenia. La teoría de la implantación podría explicar la endometriosis peritoneal con la subsiguiente reacción inflamatoria provocada por la menstruación retrograda. Estos autores postulan que la metaplasia celómica del epitelio invaginado causarían los endometriomas ováricos (Nisolle y Donnez, 1997).

De esta forma, la respuesta inflamatoria vista en estadios mínimos y leves de la enfermedad que se acompaña de niveles elevados de IL-6 no tendría porque observarse en los endometriomas por que la histogénesis de la enfermedad sería distinta.

Volviendo a las diferencias en los niveles de IL-6 en suero entre nuestro estudio y los publicados en la literatura (Bedaiwy y cols., 2002; Pellicer y cols., 1998; Somigliana y cols., 2004; Iwabe y cols., 2003; Daraï y cols., 2003) un tercer punto de discrepancia es la fase del ciclo menstrual en la que las muestras de sangre son recogidas. Ninguno de los estudios antes nombrados seleccionan la fase del ciclo y obtienen las muestras de forma aleatoria en fase proliferativa o secretora indistintamente, sin encontrar diferencias en los niveles de IL-6 entre las distintas fases. Nosotros decidimos recoger la sangre únicamente en la fase folicular para evitar artefactos debidos a las posibles variaciones hormonales que podría sufrir la IL-6 ya que hay estudios que muestran que la estimulación ovárica con gonadotropinas altera la secreción de IL-6 (Pellicer y cols., 1998) o bien, que los niveles de IL-6 en sangre han sido menores en la fase lútea

(Angstwurm y cols., 1997; Schwarz y cols., 2000) aunque otros autores no han encontrado diferencias en los niveles de IL-6 en suero a lo largo del ciclo menstrual (Makinoda y cols., 1996; Chiu y cols., 2000). Es necesario, pues, la realización de estudios longitudinales en los que se obtengan análisis seriados de una misma mujer en distintas fases del ciclo ya que presentan una menor influencia de la variación interindividual que los transversales como Bedaiwy y cols., 2002; Pellicer y cols., 1998; Somigliana y cols., 2004; Iwabe y cols., 2003; Daraï y cols., 2003, en los que se obtiene una sola muestra por mujer y fase del ciclo. Por lo tanto, consideramos que hasta entonces la selección de una fase del ciclo para el estudio de IL-6 en suero es relevante.

Finalmente, el uso de los diferentes ensayos disponibles comercialmente puede producir diferencias entre los estudios. Somigliana y cols. obtienen niveles de IL-6 hasta 10 veces menores que los aportados por otros autores que emplean el mismo ensayo (Bedaiwy y cols., 2002 y el presente trabajo) o diferentes (Iwabe y cols., 2003; Daraï y cols., 2003).

Nosotros establecemos como punto de corte para el diagnóstico de endometriosis mínima-leve en 25,75 pg/ml con una sensibilidad de 75,0% y una especificidad del 83,3%. Bedaiwy y cols. (2002) sugieren como punto discriminatorio de endometriosis 2 pg/ml de IL-6 con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 67%. A pesar de usar el mismo ensayo para la determinación de IL-6, en nuestro estudio estos bajos niveles los encontramos en la mayor parte de los controles y en todas las patologías que hemos considerado. De forma similar, otros autores han hallado estos niveles en mujeres con tumores ováricos benignos (Daraï y cols., 2003), no confirmándose el rendimiento diagnóstico del punto de corte propuesto por Bedaiwy y cols., hasta ahora el único publicado en la literatura.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para el de corte de 25,75 pg/ml – sensibilidad del 75,0%, especificidad del 83,3%, VPP del 65,8% y VPN del 88,6% – muestran la IL-6 como una herramienta útil para el manejo de las pacientes con esterilidad de origen desconocido, dolor pélvico crónico o dispareunia/dismenorrea, pudiendo llevar al clínico a indicar una laparoscopia para confirmar el diagnóstico o permitirle elegir el tratamiento

médico más adecuado para cada caso. Si bien el uso combinado de dos puntos de corte, 20 y 35 pg/ml, nos permite conseguir mejores resultados predictivos para endometriosis mínima y leve. Así, si la IL-6 en suero tiene un valor mayor o igual a 35 pg/ml, la probabilidad de endometriosis I-II es del 74,3% (VPP). Mientras que si el nivel de IL-6 es menor o igual a 20 pg/ml descartaremos la endometriosis mínima-leve con una probabilidad del 92,5% (VPN).

El papel de la laparoscopia diagnóstica en el protocolo de estudio de pacientes estériles está cuestionado por algunos autores (Fatum y cols., 2002). El uso de la IL-6 en pacientes estériles podría justificarse para identificar el subgrupo que se beneficiaría de una laparoscopia temprana, ya que el tratamiento de la endometriosis mínima y leve mejora la posibilidad de gestación en estas pacientes (Marcoux y cols., 1997; Jacobson y cols., 2004).

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los niveles en suero de IL-6 están aumentados en pacientes con endometriosis mínima y leve.
2. Los valores de IL-6 en suero no se ven afectados por otras posibles patologías ginecológicas tales como miomas y patología ovárica benigna.
3. El punto de corte para la IL-6 en suero se puede establecer en 25,75 pg/ml con una sensibilidad del 75,0% y una especificidad del 83,3%. El uso combinado de dos puntos de corte, 20 y 35 pg/ml, nos permite conseguir mejores resultados predictivos para endometriosis mínima y leve. A la luz de estos resultados, la IL-6 podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de la endometriosis mínima y leve. Así, pacientes con esterilidad de origen desconocido con niveles aumentados de IL-6 en suero podrían beneficiarse de una

laparoscopia temprana para confirmar la existencia de endometriosis y tratarla.

4. El CA-125 está aumentado en pacientes con endometriosis moderada y grave, pero no en la mínima y leve. Únicamente tendría una utilidad relativa, dada su baja sensibilidad, en el diagnóstico de la endometriosis moderada y severa, cuya primera sospecha diagnóstica nos viene dada por la ecografía transvaginal, que habitualmente ya se ha realizado a la paciente y que ofrece un mejor rendimiento diagnóstico.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Acién P, Pérez-Albert G, Quereda FJ, Sánchez-Ferrer M, García-Almela A, Velasco I. Treatment of endometriosis with transvaginal ultrasound-guided drainage under GnRH analogues and recombinant interleukin-2 left in the cysts. *Gynecol Obstet Invest.* 2005; 60:224-31.

Acién P, Quereda FJ, Gómez-Torres MJ, Bermejo R, Gutierrez M. GnRH analogues, transvaginal ultrasound-guided drainage and intracystic injection of recombinant interleukin-2 in the treatment of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2003; 55:96-104.

Akoum A, Lemay A, Paradis I, Rheault N, Maheux R. Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by proinflammatory cytokines and sex steroids. *Hum Reprod* 1996; 11:2269-75.

Alcázar JL, Laparte C, Jurado M, López-García G. The role of transvaginal ultrasonography combined with color velocity imaging and pulsed Doppler in the diagnosis of endometrioma. *Fertil Steril* 1997; 67:487-491.

American Society for Reproductive Medicine. "Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996". *Fertil Steril* 1997; 67:817-21.

Angstwurm MW, Gartner R, Ziegler-Heitbrock HW. Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. *Cytokine* 1997; 9: 370-4.

Arici A, Head J, MacDonald PC, Casey ML. Regulation of interleukine-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 94:195-204.

Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Oral E, Olive DL. Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1201-1205.

Azem F, Lessing JB, Geva E. Patients with stages III and IV endometriosis have a poor outcome of in vitro fertilization embryo transfer than patients with tubal infertility. *Fertil Steril* 1999; 72:1107-1109.

Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Jacobs RD, Tomar RH. Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 271-275.

Barbieri R. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:565-567.

Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC, Scaetzel E, Kistner RW, Knapp RC. Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986; 45:630-634.

Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1983; 309:883-887.

Bazot M, Detchev R, Cortez A, Amouyal P, Uzan S, Daraï E. Transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography for the assessment of pelvic endometriosis: a preliminary comparison. *Hum Reprod* 2003; 18:1686-1692.

Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, Agarwal A. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod* 2002; 17: 426-431.

- Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta* 2004; 340: 41-56.
- Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:48-59.
- Braun DP, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowsky WP. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57:1203-1210.
- Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10: 365-9.
- Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis. An association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:106-112.
- Brosens IA, Brosens JJ. Is laparoscopy the gold standard for the diagnosis of endometriosis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 88:117-119.
- Burgueño MJ, Garcia-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin* 1995; 104:661-670.

Chapron C, Dubuisson JB. Management of deep endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:276-280.

Chapron C, Dubuisson JB, Pansini V, Vieira M, Faucornnier A, Barakat, Dousset B. Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltration endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2002; 9:115-119.

Chen FP, Soong YK, Lee N, Lo SK. The use of serum CA-125 as a marker for endometriosis in patients with dysmenorrhea for monitoring therapy and for recurrence of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:665-670.

Cheong YC, Shelton JB, Laird SM, Richmond M, Kudesia G, Li TC, Ledger, W.L. IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Hum. Reprod.*, 2002; 17: 69–75.

Chiu KM, Arnaud CD, Ju J, Mayes D, Bacchetti P, Weitz S, Keller ET. Correlation of estradiol, parathyroid hormone, interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor during the normal menstrual cycle. *Bone* 2000; 26:79-85.

Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Polan ML. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA

expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001; 75:152-159.

Cornillie FJ, Osterlinck D, Lauweryns JM, Konick PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53:978-983.

Cramer DW. Epidemiology of endometriosis. 1987. In: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. New York: Alan R. Liss, Inc.; 5

D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, Dunselmen GA, Evers HL, Koninckx PR. Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 1994; 62: 635-638.

Daniel Y, Geva E, Amit A, Eshed-Englender T, Baram A, Fait G. Do soluble cell adhesion molecules play a role in endometriosis? *Am J Reprod Immunol* 2000; 43:160-166.

Daraï E, Detchev R, Hugol D, Tran Quang N. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod* 2003; 18: 1681-1685.

De Placido G, Alviggi C, Di Palma G, Carravetta C, Matarese G, Landino G. Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions. *Hum Reprod* 1998; 13:3206-3210.

Dessole S, Farina M, Rubattu G, Cosmi E, Ambrosini G, Nardelli GB. Sonovaginography is a new technique for assessing rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 79:1023-1027.

Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1994; 159:7-14.

Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 4: 696-701.

Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernández BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16:1802-1808.

Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988a; 82:707-710.

Dunselman GA, Bouckaert PX, Evers JL. The acute-phase response in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988b; 83:803-808.

Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 1988; 50:573-579.

Eskenazi B, Warner M, Bonsignore L, Olive D, Samuels S, Vercellini P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:929-935.

Evers JL, Dunselman GA, Van der Linden PJ. Markers for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 7:715-739.

Eyster KM, Boles AL, Brannian JD, Hansen KA. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:38-42.

Fatum M, Laufer N, Simon A. Investigation of the infertile couple: should diagnostic laparoscopy be performed after normal

hysterosalpingography in treating infertility suspected to be of unknown origin? Hum Reprod 2002; 17:1-3

Fedele L, Bianchi S, Raffaelli R, Portugese A. Pre-operative assessment of bladder endometriosis. Hum Reprod 1997; 12:2519-2522.

Franssen AM, Van der Heijden PF, Thomas CM, Doesburg WH, Willemsen WN, Rolland R. On the origin and significance of serum CA-125 concentrations in 97 patients with endometriosis before, during and after buserelin acetate, nafarelin or Danazol. Fertil Steril 1992; 57:974-979.

Gagné D, Rivard M, Pagé M, Lépine M, Platon C, Shazand K, Hugo P, Gosselin D. Development of a non surgical diagnostic tool for endometriosis based on the detection of endometrial leukocyte subsets and serum CA-125 levels. Fertil Steril 2003; 80:876-885.

García-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: a role in endometriosis. Mol Hum Reprod 1999a; 5:642-650.

García-Velasco JA, Arici A. Interleukin-8 stimulates the adhesion of endometrial stromal cells to fibronectin. Fertil Steril 1999b; 72:336-340.

García-Velasco JA, Arici A. Interleukin-8 expression in endometrial stromal cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. *Mol Hum Reprod* 1999c; 5:1135-1140.

Garrido N, Navarro J, Remohí J Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000; 6:67-74.

Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 1987; 70:115-122.

Gorospe WC, Hughes FM, Spangelo BL. Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 1992; 130:1750-1752.

Guerreiro S, Mais V, Ajossa S, Paoletti AM, Angiolucci M, Labate F, Melis GB. The role of endovaginal ultrasound in differentiating endometriomas from other ovarian cystic. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1995; 22:20-22.

Guerreiro S, Mais V, Ajossa S, Paoletti AM, Angiolucci M, Melis GB. Transvaginal ultrasonography combined with CA-125 plasma levels in the diagnosis of endometrioma. *Fertil Steril* 1996; 65:293-298.

Guerreiro S, Ajossa S, Mais V, Risalvato A, Lai MP, Melis GB. The diagnosis of endometriosis using color Doppler energy imaging. *Hum Reprod* 1998; 13:1691-1695.

Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod* 1996; 11:878-880.

Halme J, Becker S, Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:783-789.

Hammond MG, Oh ST, Anners J, Surrey ES, Halme J. The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:1131-1136 (discussion 1136-8)

Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 1981; 35:696-698.

Haney AF, Jenkins S, Winberg JB. The stimulus responsible for the peritoneal fluid inflammation observed in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56: 408-413.

- Hang L, Slack JH, Amundson C, Izui S, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Induction of murine autoimmune disease by chronic polyclonal B cell activation. *J Exp Med* 1983; 157:874-883.
- Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Oonohara Y, Tanokawa M. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:593-597.
- Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:1-10.
- Harada T, Kubota T, Aso T. Usefulness of CA 19-9 versus CA 125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:733-739.
- Ho HN, Wu MY, Yang YS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 400-412.
- Hock DL, Dagostino L, Kemmann E, Seifer DB. Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med* 2001; 46: 7-10.
- Hornstein MD, Thomas PP, Gleason RE, Barbieri RL. Menstrual cyclicity of CA 125 in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58:279-283.

Houston DE, Noller RL, Melton LJ. Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1970. *Am J Epidemiol* 1987; 125:959-969.

Houston DE, *Epidemiol Rev*, 1994; 6:167

Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhance interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67:1059-1064.

Imai A, Horibe S, Takagi A, Takagi H, Tamaya T. Drastic elevation of serum CA 125, CA 72-4 and CA 19-9 levels during menses in patients with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 78:79-81.

Ishimaru T, Masuzaki H, Samejima T, Fujishita A, Nakamura K, Yamabe T. Influence of ovarian endometrioma on fertility. *AM J Obstet Gynecol* 1994; 171: 541-545.

Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N. Pathogenic significance of levels of interleukin-8 in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 924-929.

Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M. Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal

cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 824-829.

Iwabe T, Harada T, Sakamoto Y, Iba Y, Horie S, Mitsunari M, Terakawa N. Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced serum interleukin-6 concentrations in patients with ovarian endometriomas. *Fertil Steril* 2003; 80: 300-304.

Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR, Olive D, Farquhar C. 2004. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis (Cochrane Review). In *The Cochrane Library*, Issue 3. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 355-358

Kabawat SE, Bast RC Jr, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol* 1983; 2: 275-285.

Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 257-261.

Keetel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 440-442.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron A, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E on behalf of the ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:2698-2704.

Khan KN, Massuzaki H, Fujishita A, Hamasaki T, Kitajima M, Hasuo A, Miyamura Y, Ishimaru T. Association of interleukin-6 and estradiol with hepatocyte growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 761-771.

Kinkel K, Chapron C, Balleyguier C, Fritel X, Dubuisson JB, Moreau JF. Magnetic resonance imaging characteristics of deep endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:1080-1086.

Kitawaki J, Ishihara H, Koshiba H, Kiyomizu M, Teramoto M, Kitaoka Y, Honjo H. Usefulness and limits of CA-125 in the diagnosis of endometriosis without associated ovarian endometriomas. *Hum Reprod* 2005; 20: 1999-2003.

Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997; 57:514-519.

Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Fushiki S, Honjo H. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72:1100-1106.

Koks CA, Dunselman GA, De Goeij AF, Arends JW, Evers JL. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril* 1997; 68: 560-564.

Laird SM, Li TC, Bolton AE. The production of placental protein 14 and interleukin 6 by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod* 1993; 8: 793-798.

Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1 β . *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 269-275.

Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75:1-10.

Mahmood TA, Templeton AA. Prevalence and genesis of endometriosis. Hum Reprod 1991; 6:554-559.

Mahnke JL, Dawood Y, Huang JH. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 73: 166-170.

Mais V, Guerreiro S, Ajossa S, Angiolucci M, Paoletti AM, Melis GB. The efficiency of transvaginal ultrasonography in the diagnosis of endometriosis. Fertil Steril 1993; 60:776-780.

Makinoda S, Mikuni M, Sogame M, Kobamatsu Y, Furuta I, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S. Erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 during the normal menstrual cycle. Int J Gynaecol Obstet 1996; 55: 265-71.

Malinak LR, Buttram VCJr, Elias S, Simpson JL. Heritage aspects of endometriosis: II: clinical characteristics of familial endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1980; 137:332-337.

Marcoux S, Maheux R, Berube S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. N Engl J Med 1997; 337:217-222.

Matalliotakis I, Panidis D, Vlassis G, Neonaki M, Goumenou A, Koumantakis E. Unexpected increase of CA 19-9 tumour marker in patients with endometriosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19:498-500.

Matalliotakis IM, Vassiliandis S, Goumenou AG, Athanassakis I, Koumantakis GE, Neonaki MA. Soluble ICAM-1 levels in the serum of endometriotic patients appear to be independent of medical treatment. *J Reprod Immunol* 2001; 51:9-19.

Mathur S, Peres MR, Williamson HO, Youmans CD, Maney SA, Garvin AJ. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50:259-266.

Mathur S, Gaza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin (Ig)G, IgA, and IgM responses in endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 54: 56-63.

Mathur S, Ghihal HJ. Antiendometrial antibodies? *Fertil Steril* 1992; 57:704-705.

Matorras R, Rodríguez F, Pijoan JI, Etxanojauregui A, Neyro JL, Elorriaga MA, Rodriguez-Escudero FJ. Women who are not exposed to spermatozoa and infertile women have similar rates of stage I endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:923-928.

Maxwell LR, Kilpatrick DC, Haining R, Smith SK. No HLA-DR specificity is associated with endometriosis. *Tissue Antigens* 1989; 34: 145-147.

Mazzeo D, Vigano P, Di Blasio AM, Sinigaglia F, Vignali M, Panina-Bordignon P. Interleukine-12 and its free p40 subunit regulate immune recognition of endometrial cells: potential role in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:911-916.

McLaren J, Prentice A, Chanock-Jones DS. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98:482-489.

McLaren J, Prentice A, Chanock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK. Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12:146-152.

Meek SC, Hodge DD, Musich JR. Autoimmunity in infertile patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1365-1373.

Mettler L, Volkov NI, Kulakov VI, Jurgensen A, Parwaresch MR. Lymphocyte subsets in the endometrium of patients with endometriosis

throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36:342-348.

Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, Bossuyt PM. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1998; 70: 1101-1108.

Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales AJ, Parthasarathy S: Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69:1092-1094.

Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:681-684.

Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585-596

Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2001; 76:223-231.

- Ohba T, Mizutani H, Maeda T, Matsuura K, Okamura H. Evaluation of endometriosis in uterosacral ligaments by transrectal ultrasonography. *Hum Reprod* 1996; 11:2014-2017.
- Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *New Engl J Med* 1993, 328: 1759-1769.
- Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril* 1995; 44:772-777.
- Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56:45-51.
- Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48:2-13.
- Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod* 1999; 14:1332-1334.

Patel MD; Feldstein VA, Chen DC, Lipson SD, Filly RA. Endometriomas: diagnostic performance of US. *Radiology* 1999; 210:739-745.

Pellicer A, Oliveira N, Gutiérrez A, Remohí J, Simón C. 1994. Implantation in endometriosis: Lessons learned from IVF and oocyte donation. In: Spinola P and Coutinho EM (eds). *Progress in Endometriosis*. Parthenon Publishing Group, Carnforth, UK. 177-183.

Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10 (suppl. 2):91-97.

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simón C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998; 70: 425-31.

Pittaway DE. Serum markers of endometrium and endometriosis. In: Diamond MP, Osteen KG; eds. *Endometrium and dysfunctional immune response*. Malden MA: Blackwell Science, 1997:31-41.

Pittaway DE, Fayeze JA. Serum CA-125 antigen levels increase during menses. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:75-76.

Prud'homme GJ, Balderas RS, Dixon JF, Theofilopoulos AN. B cell dependence on response to accessory signals in murine lupus strains. *J Exp Med* 1983; 157:1815-1827.

Punnonen J, Teisala K, Ranta H. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1522-1526.

Rier SE, Zarmakoupis PN, Hu X, Becker JL. Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1431-1437.

Rock JA, Hurst BS. Clinical significance of prostanoid concentration in women with endometriosis, 1990. In: Currents concepts in endometriosis. Eds. Chadha DR, Buttram VC, editors. New York: Alan R Liss, 61.

Rosenfel DL, Lecher BD. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 105.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422 - 469.

Sanfilippo JS, Wakin NG, Schikler KN, Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 39-43.

Schutter MJ, Davelaar EM, Van Kamp GJ, verstraeten RA, Kenemans P, Verheijen HM. The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:385-392.

Schwarz E, Shafer C, Bode JC, Bode C. Influence of the menstrual cycle on the LPS-induced cytokine response of monocytes. *Cytokine* 2000; 12:413-416.

Sharpe-Timms KL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM. Differential expression and localization of de-novo synthesized endometriotic haptoglobulin in endometrium and endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2000; 15:2180-2185.

Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3112-3118.

Sidell N, Han SW, Parthasarathy S. Regulation and modulation of abnormal immune responses in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:159-173 (discussion 199-200, 396-406).

Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum R. Regulation of matrix metalloproteinase and their inhibitor in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95:167-174.

Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994; 9:725-729.

Somigliana E, Viganò P, Tirelli AS, Felicetta I, Torresani E, Vignali M, Di Blasio AM. Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9, and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. *Hum Reprod* 2004; 19: 1871-1876.

Somigliana E, Viganò P, Candiani M, Felicetta I, Di Blasio AM, Vignali M. Use of serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 as a new marker of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:1028-1031.

Startseva NV. Clinical immunological aspects of genital endometriosis. Akus Ginekol 1980; 3:23-26.

Stefansson H, Geirsson RT, Steinhorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. Hum Reprod 2002; 17:555-559.

Stratton P, Craig W, Premkumar A et al. Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. Fertil Steril 2003; 79:1078-1085.

Sugawara J, Fukaya T, Marakami T, Yoshida H, Yajima A. Increased secretion of hepatocyte factor by eutopic endometrial stromal cells in women with endometriosis. Fertil Steril 1997; 69:303-308.

Sung L, Mukherjee T, Takeshige T. Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. J Assist Reprod Genet 1997; 14:152-156.

Switchenko AC, Kauffman RS, Becker M. Are there antiendometrial antibodies in sera of women with endometriosis? Fertil Steril 1991; 56: 235-241.

Syrop CH, Halme J. Cyclic changes of peritoneal fluid parameters in normal and infertile patients. *Obstet Gynecol* 1987a; 69: 416-418

Syrop CH, Halme J. Peritoneal fluid environment and infertility. *Fertil Steril* 1987b; 48:1-9.

Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT. Cytokine-induced production of INF-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells: modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol* 1989; 142:3134-3139.

Takahashi K, Okada M, Okada S, Kitao M, Imaoka I, Sugimora K. Studies on the detection of small endometrial implants by magnetic resonance imaging a fat saturation technique. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 41:203-206.

Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF. Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 1997; 828:194-207.

Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002a; 955:89-100.

Taylor RN, Lundeen SG, Giudice LC. Emerging role of genomics in endometriosis research. *Fertil Steril* 2002b; 78:694-698.

Te Linde RW, Scott RB. Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 60: 1147-1173.

Telimaa S, Kauppila A, Ronnberg L, Suikkari AM, Seppala M. Elevated serum levels of endometrial secretory protein PP14 in patients with advanced endometriosis. Suppression by treatment with danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:866-871.

Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1118-1122.

Tsuda T, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Pagano Y, Ito M. Altered gene expression and secretion of interleukine-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril* 2000; 73:205-211.

Vaisse C, Atger M, Potier B, Milgrom E. Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA Cell Biol* 1990; 9:401-413.

Velasco I, Campos A, Acién P. Changes in cytokine levels of patients with ovarian endometriosis after treatment with gonadotropin-releasing hormone analogue, ultrasound-guided drainage, and intracystic recombinant interleukin-2. *Fertil Steril*. 2005 Apr; 83:873-7.

Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 1996; 65:299-304.

Viganó P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecular (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus in endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:1150-1156.

Vigenó P, Somigliana E, Gaffuri B, Santorsolo R, Busacca M, Vignali M. Endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule 1 and endometriosis: relationship to the extent of the disease. *Obstet Gynecol* 2000; 95:115-119.

Walter A, Hentz J, Magtibay P, Cornella J, Magrina J. Endometriosis: Correlatoin between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1407-1413.

Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? Clin Obstet Gynecol 1980; 23:885-893.

Wild RA, Shivers CA, Medders D. Detection of antiendometrial antibodies in patients with endometriosis: methodological issues. Fertil Steril 1992;58:518-521.

Wild RA, Hirisave V, Podczaski ES, Coulam C, Shivers CA, Satyaswaroop PG. Autoantibodies associated with endometriosis: can their detection predict presence of the disease? Obstet Gynecol 1991;77:927-931.

Witz CA, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. Am J Reprod Immunol 1994; 32: 173-179.

Witz CA, Montoya-Rodríguez IA, Schenken RS. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. Fertil Steril 1999; 71: 56-60.

Wu MY, Yang JH, Chao KH, Hwang JL, Yang YS, Ho HN. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 74:1187-1191.

Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:285-296.

Wu MH, Yang BC, Hsu CC, Lee YC, Huang KE. The expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 70:1139-1142.

Ye C, Ito K, Komatsu Y, Takagi H. Extremely high levels of CA 19-9 and CA 125 antigen in benign mucinous ovarian cystadenoma. *Gynecol Oncol* 1994; 52:267-271.

Yoshioka H, Harada T, Iwabe T, Nagano Y, Taniguchi F, Tanikawa M, Terakawa N. Menstrual cycle-specific inhibition of the proliferation of endometrial stromal cells by interleukin-6 and its soluble receptor. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:1088-1094.

Zarmakoupis PN, Rier SE, Moroulis GB, Becker JL. Inhibition of human endometrial stromal cell proliferation by interleukin-6. *hum Reprod* 1995; 10:2395-2399.

Zhang RJ, Wild RA, Ojago JM. Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells:an in vitro system. *Fertil Steril* 1993; 59:1196-1201.